



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

GISANARA DORS

**ETANÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE PALMA VISANDO À
PRODUÇÃO DE BIODIESEL EM SISTEMA CONTÍNUO**

Florianópolis
2011

GISANARA DORS

**ETANÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE PALMA VISANDO À
PRODUÇÃO DE BIODIESEL EM SISTEMA CONTÍNUO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Química, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Co-orientador: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Florianópolis
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

D717e Dors, Gisanara

Etanolise enzimática do óleo de palma visando à produção de biodiesel em sistema contínuo [tese] / Gisanara Dors ; orientador, Agenor Furigo Junior. - Florianópolis, SC, 2011. 231 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia química. 2. Biodiesel. 3. Lipase. 4. Alcoolise. 5. Reatores - Testes de materiais. I. Furigo Junior, Agenor. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU 66.0

Gisanara Dors

**ETANÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE PALMA VISANDO À
PRODUÇÃO DE BIODIESEL EM SISTEMA CONTÍNUO**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor
em Engenharia Química, e aprovada, em sua forma final, pelo
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Florianópolis, 28 de fevereiro de 2011.

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Orientador - Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro
Co-Orientadora - Universidade de São Paulo – Escola de
Engenharia de Lorena

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Franciello Vendruscolo
Universidade Federal de Goiás

Dra. Larissa de Freitas
Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena

Profa. Dra. Glaucia Maria Falcão de Aragão
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Claudia Sayer
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Cíntia Soares
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus queridos avós, Humilde e Jacob Dors e Zélia e Atilio Baranceli (in memorian), por serem exemplos de vida, sabedoria, honestidade, respeito e fé.

Aos meus amados pais, Cleuza e Pedrinho, por serem os grandes responsáveis pela realização deste sonho, por cada ensinamento e princípio plantado em meu coração e pelo amor incondicional.

As minhas maravilhosas irmãs, Giniani e Janaina, pelo companheirismo, apoio, amizade e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado sempre, me fortalecer e tornar possível esta conquista.

À minha família, meus pais, Cleuza e Pedrinho, minhas irmãs, Giniani e Janaina, e meus avós, que mesmo distantes fisicamente, estiveram presentes em cada momento desta caminhada, obrigada pelo apoio moral e afetivo e pelo incentivo constante à minha formação. Obrigada pelas orações nos momentos difíceis, pela compreensão, carinho, paciência, pelo amor a mim dedicado. Vocês são a base da minha vida, sem vocês nada disso seria possível.

Ao Marcelo, pelo incansável companheirismo e amor dedicados. A tua compreensão pela minha ausência, o teu cuidado, carinho e paciência nos momentos difíceis e teu amor, tornaram essa conquista possível. Esta conquista é sua também.

Quando concluímos um projeto, percebemos que muitos nomes importantes o compuseram.

Um agradecimento especial a duas pessoas fantásticas que tive a oportunidade de conhecer, conviver e admirar, pelos seus conhecimentos, humildade, paciência, e dedicação, a vocês meus estimados orientadores, Prof. Agenor Furigo Junior e Profa. Heizir Ferreira de Castro, meu muitíssimo obrigado.

Agradeço a família Engebio que, durante meu mestrado e doutorado, muito me ensinou e ajudou no meu amadurecimento como profissional. A todos que passaram pelo Engebio desde 2004 obrigado pela convivência, pela amizade, pelas discussões, soluções e pela troca de informações. Em especial ao grupo de Biocatálise: Américo, Manuela, Sabrina, Francisca, Joanna e Rosana e aos meus ICs adotados: Luiza, Anderson, Felipe, Joel, Bruna e Daniel. Obrigada Engebio.

Aos professores do Engebio, Glauca, Willibaldo, Jorge e José Miguel pela oportunidade de conhecer e aprender sempre.

A Denise e Manuela, queridas amigas, obrigada pelo carinho, pelas longas conversas e pela amizade.

Aos queridos amigos do Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena: Ariela, André, Aline, Grazielle, Daniel, Gisele, Larissa, Matheus, Patrícia, Jose Roberto, Karine, Livia, Murilo, Weriton, Matheus, Profs. Adriano e Júlio, obrigado pela maravilhosa receptividade e amizade, pela paciência e disponibilidade, por todos os conhecimentos passados, guardo vocês no meu coração. Patrícia e Matheus obrigado pelas análises de cromatografia gasosa.

Ao Laboratório de Controle de Processos - UFSC, em especial ao amigo Rafael Dias, pelas análises de cromatografia gasosa e pelas longas discussões.

Ao Grupo Agropalma pela doação do óleo de palma e a Novozymes Latin América pela doação da lipase Novozym® 435.

Ao Edevilson, secretário da pós-graduação, por sempre estar disposto a ajudar e resolver os problemas prontamente.

A UFSC e ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, seus professores e funcionários, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, Dr. Franciello Vendruscolo, Dra. Glaucia Maria Falcão de Aragão, Dra. Claudia Sayer, Dra. Cíntia Soares e a Dra. Larissa de Freitas por terem gentilmente aceitado fazer parte da banca examinadora deste trabalho. Exprimo aqui o meu reconhecimento.

A CAPES e ao CNPQ pelo suporte financeiro.

E a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

*O que eu faço, é uma gota no meio de um oceano.
Mas sem ela, o oceano será menor.*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A tecnologia estabelecida para a produção industrial de biodiesel é baseada na transformação química de óleos vegetais com metanol, utilizando catalisadores homogêneos para promover a clivagem das moléculas de triglicerídeos e gerar uma mistura de ésteres de ácidos graxos. Novas tecnologias vêm sendo pesquisadas, sobretudo no desenvolvimento de catalisadores e processos contínuos. O presente trabalho teve como objetivo estudar a reação de alcoólise enzimática do óleo de palma com etanol visando à produção de biodiesel em sistema contínuo na ausência e presença de solvente (terc-butanol); para tanto, foram utilizadas as lipases de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (AK SiO₂-PVA) e de *Candida antarctica*, imobilizada comercialmente, Novozym® 435. Foi determinado o comportamento da reação de alcoólise em reator do tipo tanque agitado com cesta e do tipo leito fixo. Os ésteres etílicos foram quantificados por cromatografia gasosa. Foi possível obter ésteres etílicos em ambos os reatores testados. Os ensaios realizados no reator tipo tanque agitado com cesta utilizando a Novozym® 435 mostraram que o solvente não influenciou na concentração e na velocidade de formação dos ésteres etílicos, no entanto provocou um aumento no rendimento. Nos experimentos realizados no reator tipo leito fixo com a lipase AK SiO₂-PVA, a presença de solvente interferiu somente no rendimento dos ésteres etílicos. Por outro lado, nos ensaios realizados com a lipase Novozym® 435, a concentração, a velocidade específica de formação e o rendimento dos ésteres etílicos aumentaram na presença do terc-butanol no meio reacional. Para a lipase AK SiO₂-PVA, a vazão de alimentação do reator tipo leito fixo de 0,025 mL min⁻¹, correspondente a um tempo espacial de 4,6 h, proporcionou maiores produtividades em ésteres etílicos, tanto na presença quanto na ausência de solvente. De maneira geral, os sistemas testados se mostraram robustos e estáveis, permanecendo no estado estacionário por longo período, principalmente quando se utilizou a lipase Novozym® 435.

Palavras-chave: biodiesel, etanólise, lipase, processo contínuo, leito fixo, tanque agitado com cesta.

ABSTRACT

The established technology for industrial production of biodiesel is based on the chemical processing of vegetable oils with methanol, using homogeneous catalysts to promote the cleavage of the triglyceride molecules and generate a mixture of fatty acid esters. New technologies have been researched, especially in developing catalysts and continuous processes. This work aimed to study the enzymatic alcoholysis reaction of palm oil with ethanol in order to produce biodiesel in a continuous system in the absence and presence of solvent (tert-butanol); to this purpose, lipases of *Pseudomonas fluorescens*, immobilized in polysiloxane - polyvinyl alcohol hybrid support (AK SiO₂-PVA), and *Candida antarctica*, commercially immobilized (Novozym® 435) were used. The behavior of the alcoholysis reaction in stirred tank reactor with basket and fixed bed type was determined. The ethyl esters were quantified by gas chromatography. Ethyl esters were produced in both reactors tested. The tests carried out in stirred tank reactor with basket using Novozym® 435 showed that the solvent did not influence the concentration and rate of formation of ethyl esters, however increased the yield. In the experiments carried out in the fixed bed reactor with lipase AK SiO₂-PVA, in the presence of solvent only affected the yield of ethyl esters. On the other hand, in the tests performed with lipase Novozym® 435, the concentration, the specific formation rate and yield of ethyl esters increased in the presence of tert-butanol in the reaction medium. For lipase AK SiO₂-PVA, the feed flow of the fixed bed reactor of 0.025 mL min⁻¹, corresponding to a space time of 4.6 h, resulted in higher yields in ethyl esters, both in the presence and absence of solvent. In general, the tested systems were robust and stable, remaining at steady state for a long period, especially when using the lipase Novozym® 435.

Keywords: biodiesel, ethanolysis, lipases, continuous system, fixed bed, stirred tank reactor with basket.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 Matriz energética (a) Mundial e (b) Brasileira.	7
Figura 2.2 Cadeia produtiva e de comercialização do biodiesel no Brasil.....	14
Figura 2.3 Produção de biodiesel no Brasil.....	15
Figura 2.4 Principais matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel (janeiro a novembro de 2010).	19
Figura 2.5 Método de extração do óleo de palma.....	22
Figura 2.6 (a) Palmeira (b) Cacho de dendê (c) Fruto do dendê. ...	23
Figura 2.7 Representação esquemática das reações catalisadas por lipases a partir de um triacilglicerol.....	29
Figura 2.8 Transesterificação de triglicerídeos com álcool (a) Equação geral (b) Reações consecutivas e reversíveis.	35
Figura 2.9 Comparação entre (a) processo químico e (b) processo enzimático para a produção de biodiesel utilizando metanol.....	39
Figura 2.10 Parâmetros que afetam o rendimento da síntese enzimática de biodiesel.	46
Figura 2.11 O micro ambiente da reação na ausência e presença de solvente.	50
Figura 2.12 Considerações importantes para seleção do biorreator.	58
Figura 2.13 Modelos de reatores para aplicações com enzimas imobilizadas (a) CSTR, (b) leito fixo, (c) leito fluidizado, (d) membranas enroladas em espiral, (e) reator de placas paralelas e (f) reator de fibras ocas.	60
Figura 2.14 Modelos de reatores com cesto (a) reator agitado com cesto acoplado ao impelidor (b) reator agitado com cesto e (c) modelos de impelidores com cesto acoplado.	62
Figura 2.15 Produção de biodiesel contínua com três biorreatores de leito fixo em série. 1, 2 e 3- armazenamento substrato; 4- biorreator leito fixo empacotado com 3 g de lipase imobilizada de <i>Candida antarctica</i> ; 5- biorreator leito fixo empacotado com 4,5 g de lipase imobilizada de <i>Candida</i>	

antarctica; 6- bomba peristáltica; 7- receptor da mistura de reação eluída.68

Figura 2.16 Processo de produção de biodiesel em reator de leito fixo.69

Figura 2.17 Esquema do reator contínuo de leito fixo. V1- tanque de alimentação; V2- tanque de coleta de produto; F1 e F2- fluxo de alimentação (--- tubo C-FLAX); F3- fluxo de alimentação (— tubo de aço inoxidável); F4, F5 e F6- produto da reação; T1 e T2- temperatura de entrada e saída do reator; P1- Bomba peristáltica e O1- Ambiente com temperatura controlada.71

Figura 3.1 Aparato experimental utilizado nos experimentos em modo contínuo de produção de biodiesel com o reator tipo tanque agitado com cesta. 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Tanque de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Reator tipo tanque agitado com cesta, 7- Saída de produto.83

Figura 3.2 (a) Dimensões da cesta de aço inox: $e = 0,02$ cm; $R = 2,3$ cm; $r = 2,28$ cm; h (total) = $5,0$ cm e h (útil) = $1,98$ cm. (b) Dimensões dos pés da cesta: $R = 0,12$ cm e $h = 1,95$ cm. (c) Foto da cesta utilizada no reator tipo tanque agitado.84

Figura 3.3 Aparato experimental utilizado nos experimentos em modo contínuo de produção de biodiesel com o reator tipo leito fixo. 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Tanque de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Reator tipo leito fixo, 7- Saída de produto.87

Figura 4.1 Experimento 1 - Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado com cesta operando em modo batelada (primeiras 6 h) e contínuo (temperatura 45°C , razão molar etanol:óleo 6:1, vazão $0,126\text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial 6 h) empregando-se 5% (m/m) da lipase Novozym® 435 (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.99

Figura 4.2 Experimento 1 - Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado com cesta operando em modo batelada (primeiras 6 h) e contínuo (temperatura 45°C , razão molar etanol:óleo 6:1, vazão $0,126\text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial 6 h) empregando-se 5% (m/m) da lipase Novozym® 435.100

- Figura 4.3** Experimento 2 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado com cesta operando em modo batelada (primeiras 6 h) e contínuo (temperatura 45 °C, razão molar etanol:óleo 6:1, vazão 0,126 mL min⁻¹, tempo espacial 6 h) empregando-se 5% (m/m) da lipase Novozym® 435 (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos. 101
- Figura 4.4** Experimento 2 - Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado com cesta operando em modo batelada (primeiras 6 h) e contínuo (temperatura 45 °C, razão molar etanol:óleo 6:1, vazão 0,126 mL min⁻¹, tempo espacial 6 h) empregando-se 5% (m/m) da lipase Novozym® 435. 102
- Figura 4.5** (a) Enzima imersa no substrato e (b) confinada na cesta. 103
- Figura 4.6** (a) Aparato experimental utilizado nos Experimentos 1 e 2 (b) Aparato experimental utilizado nos Experimentos 3 e 4.. 104
- Figura 4.7** Experimento 3 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado com cesta em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, vazão 0,069 mL min⁻¹, tempo espacial 13,4 h) empregando-se 5% (m/m) da lipase Novozym® 435 (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos..... 105
- Figura 4.8** Experimento 3 - Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado com cesta em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, vazão 0,069 mL min⁻¹, tempo espacial 13,4 h) empregando-se 5% (m/m) da lipase Novozym® 435. 106
- Figura 4.9** Experimento 4 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado com cesta em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, 30% (v/v) em relação ao óleo de palma de terc-butanol, vazão 0,07 mL min⁻¹, tempo espacial 13,1 h) empregando-se 5% (m/m) da lipase Novozym® 435 (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos..... 107
- Figura 4.10** Experimento 4 - Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque

agitado com cesta em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, 30% (v/v) em relação ao óleo de palma de terc-butanol, vazão 0,07 mL min⁻¹, tempo espacial 13,1 h) empregando-se 5% (m/m) da lipase Novozym® 435.....108

Figura 4.11 Experimento 5 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanólise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 6:1, vazão 0,017 mL min⁻¹, tempo espacial 9,6 h, adição de Triton X-100 10% (m/v) em relação ao substrato em 194 h de reação) empregando-se a lipase Novozym® 435 (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.....110

Figura 4.12 Experimento 5 - Rendimento da reação de etanólise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 6:1, vazão 0,017 mL min⁻¹, tempo espacial 9,6 h, adição de Triton X-100 10% (m/v) em relação ao substrato em 194 h de reação) empregando-se a lipase Novozym® 435.111

Figura 4.13 Experimento 5 – (a) Formação de bolha de ar na entrada do reator e de duas fases no substrato alimentado. (b) Formação de caminhos preferenciais no leito. (c) Substrato alimentado sem a formação de fases (após adição do surfactante Triton X-100) e bolha de ar na entrada do reator.112

Figura 4.14 Experimento 6 – Aparato experimental utilizado no Experimento 4, destacando a utilização da resistência elétrica envolvendo a mangueira de alimentação.....113

Figura 4.15 Experimento 6 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanólise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 6:1, adição de Triton X-100 na proporção 10% (m/v) em relação ao substrato, vazão 0,020 mL min⁻¹, tempo espacial 5,0 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.....114

Figura 4.16 Experimento 6 - MEV (a) Biocatalisador original antes da reação e (b) biocatalisador após a reação. Reação de etanólise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 6:1, adição de Triton X-100 na proporção 10% (m/v) em relação

ao substrato, vazão $0,020 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial 5,0 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA. 115

Figura 4.17 Experimento 6 - Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 6:1, adição de Triton X-100 na proporção 10% (m/v) em relação ao substrato, vazão $0,020 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial 5,0 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA. 116

Figura 4.18 Experimento 6 – (a) Bolhas no reator de leito fixo. (b) Rachadura no leito provocada pelo deslocamento das bolhas. (c) Leito de enzima deslocado devido às bolhas de ar. 118

Figura 4.19 Experimento 7 - Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, adição de terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão $0,021$ a $0,030 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial de 5,5 a 3,7 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA. 119

Figura 4.20 Experimento 7 – Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos obtida da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, adição de terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão $0,021$ a $0,030 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial de 5,5 a 3,7 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA. 120

Figura 4.21 Experimento 7 – Produtividade e concentração de ésteres etílicos no estado estacionário obtidos da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, adição de terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão $0,021$ a $0,030 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial de 5,5 a 3,7 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA.... 121

Figura 4.22 Experimento 7 – Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, adição de terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão $0,021$ a $0,030 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial de 5,5 a 3,7 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA.... 121

Figura 4.23 Experimento 8 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, presença do solvente terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão 0,025 mL min ⁻¹ , tempo espacial 4,6 h) empregando-se a lipase AK SiO ₂ -PVA (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.....	123
Figura 4.24 Experimento 8 – Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, adição de terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão 0,025 mL min ⁻¹ , tempo espacial 4,6 h) empregando-se a lipase AK SiO ₂ -PVA.....	124
Figura 4.25 Experimento 9 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, ausência de solvente, vazão 0,021 e 0,025 mL min ⁻¹ , tempo espacial de 5,5 e 4,4 h) empregando-se a lipase AK SiO ₂ -PVA. (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.....	125
Figura 4.26 Experimento 9 – Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, ausência de solvente, vazão 0,021 e 0,025 mL min ⁻¹ , tempo espacial de 5,5 e 4,4 h) empregando-se a lipase AK SiO ₂ -PVA....	126
Figura 4.27 (a) Tanque de alimentação do substrato com saída inferior (b) Tanque de alimentação do substrato com saída superior.....	128
Figura 4.28 Experimento 10 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, ausência de solvente, vazão 0,016 mL min ⁻¹ , tempo espacial 7,0 h) empregando-se a lipase Novozym® 435 (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.....	129
Figura 4.29 Experimento 10 – (a) Bolha de ar na parte inferior do reator de leito fixo. (b) Bolha de ar levantando o leito de enzima. (c) Bolha de ar dividindo o leito de enzima em duas partes. (d) Bolha de ar levantando o leito de enzima por inteiro....	130

Figura 4.30 Experimento 10 – Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, ausência de solvente, vazão 0,016 mL min ⁻¹ , tempo espacial 7,0 h) empregando-se a lipase Novozym® 435.....	131
Figura 4.31 Experimento 11 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, adição de terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão 0,018 mL min ⁻¹ , tempo espacial 6,1 h) empregando-se a lipase Novozym® 435 (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.....	133
Figura 4.32 Experimento 11 – Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, adição de terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão 0,018 mL min ⁻¹ , tempo espacial 6,1 h) empregando-se a lipase Novozym® 435.	134
Figura 4.33 Experimento 4 – Cromatograma da amostra de 240 h de reação. Etanolise enzimática do óleo de palma em modo contínuo em reator tipo tanque agitado com cesta (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo, tempo espacial 13,1 h) empregando-se a lipase Novozym® 435.	136
Figura 4.34 Experimento 11 – Cromatograma da amostra de 240 h de reação. Etanolise enzimática do óleo de palma em modo contínuo em reator tipo leito fixo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo, tempo espacial 6,1 h) empregando-se a lipase Novozym® 435.....	136
Figura 4.35 Experimento batelada com terc-butanol – Cromatograma da amostra de 24 h de reação. Etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado em modo batelada (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, 5% (m/m) de lipase em relação a massa total de substrato; reação realizada em <i>shaker</i> com duração de 24 h) empregando-se a lipase Novozym® 435.....	137
Figura 4.36 (a) Produtividade de ésteres etílicos dos ensaios realizados com a lipase AK SiO ₂ -PVA. (b) Comportamento da	

produtividade de ésteres etílicos em função da vazão no estado estacionário. Condições reacionais: razão molar etanol:óleo de palma de 9:1, 50 °C, reator tipo leito fixo operando em modo contínuo utilizando a lipase AK SiO₂-PVA. Exp 7: presença de solvente com variação da vazão de 0,021, 0,025 e 0,030 mL min⁻¹, Exp 8: presença de solvente utilizando a vazão de 0,025 mL min⁻¹ e Exp 9: ausência de solvente com variação da vazão 0,021 e 0,025 mL min⁻¹. 139

Figura 4.37 (a) Produtividade de ésteres etílicos dos ensaios realizados com a lipase Novozym® 435. (b) Comportamento da produtividade de ésteres etílicos em função da vazão no estado estacionário. Condições reacionais: razão molar etanol:óleo de 9:1, 50 °C utilizando a lipase Novozym® 435. Exp 3: reator tipo tanque agitado com cesta, ausência de solvente utilizando a vazão de 0,069 mL min⁻¹ e Exp 4: reator tipo tanque agitado com cesta, presença de solvente utilizando a vazão de 0,070 mL min⁻¹. Exp 10: reator tipo leito fixo, ausência de solvente utilizando a vazão de 0,016 mL min⁻¹, Exp 11: reator tipo leito fixo, presença de solvente utilizando a vazão de 0,018 mL min⁻¹. 140

Figura 4.38 Viscosidade absoluta versus rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em modo contínuo (razão molar 9:1 etanol:óleo, 50 °C). Reações realizadas em reator tipo tanque agitado com cesta com a lipase Novozym® 435: Exp 3: ausência de solvente e Exp 4: presença de solvente. Reações realizadas em reator tipo leito fixo: Exp 9: ausência de solvente, AK SiO₂-PVA; Exp 10: ausência de solvente, Novozym® 435; Exp 11: presença de solvente, Novozym® 435. 142

Figura 4.39 Experimento 5 - MEV (a) Biocatalisador original antes da reação e (b) biocatalisador após a reação. Etanolise enzimática do óleo de palma em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 6:1, tempo espacial 9,6 h, adição de Triton X-100 10% (m/v) em relação ao substrato em 194 h de reação) empregando-se a lipase imobilizada Novozym® 435. 144

Figura 4.40 Composição molar dos monoésteres dos ensaios com a lipase (a) AK SiO₂-PVA em reator de leito fixo, Exp 6: presença de Triton; Exp 7 e 8: presença de solvente; Exp 9: ausência de solvente, (b) Novozym® 435 em reator de leito fixo. Exp 5 e 10: ausência de solvente; Exp 11: presença de solvente, (c) Novozym® 435 em reator tanque agitado com

cesta Exp 3: ausência de solvente e Exp 4: presença de solvente. A composição molar do óleo é apresentada em termos de ácidos graxos correspondente aos ésteres da legenda..... 146

Figura 4.41 Atividade residual da enzima em função do tempo e ajuste ao Modelo de desativação de Sadana para a reação de etanólise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, adição de terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão 0,025 mL min⁻¹, tempo espacial 4,6 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA. 148

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Características físico-químicas de alguns óleos vegetais <i>in natura</i> e do óleo diesel.....	11
Tabela 2.2 Características físico-químicas do biodiesel (ésteres etílicos) de várias espécies vegetais e do óleo diesel convencional.....	12
Tabela 2.3 Classificação das matérias-primas para a produção de biodiesel.	17
Tabela 2.4 Produção de óleo de várias culturas de plantas oleaginosas.	18
Tabela 2.5 Características físico-químicas do óleo de palma refinado.....	23
Tabela 2.6 Comparação entre as vantagens e desvantagens do uso do etanol e metanol na produção de biodiesel.....	25
Tabela 2.7 Comparação entre diferentes tecnologias de produção do Biodiesel.	38
Tabela 2.8 Micro-organismos produtores de lipases utilizadas em estudos sobre a produção biodiesel, em sistemas contendo ou não solventes orgânicos.....	47
Tabela 2.9 Processos contínuos de alcoólise enzimática para a produção de biodiesel em reator tipo leito fixo.....	67
Tabela 3.1 Propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (SiO ₂ -PVA) catalisando a hidrólise do azeite de oliva.	77
Tabela 3.2 Características do óleo de palma refinado fornecido pela Agropalma.	78
Tabela 3.3 Composição em ácidos graxos do óleo de palma refinado.....	78
Tabela 3.4 Equipamentos utilizados nos ensaios.....	79
Tabela 3.5 Condições utilizadas nos experimentos realizados no reator tipo tanque agitado com cesta, utilizando a lipase Novozym® 435.....	84

Tabela 3.6 Condições utilizadas nos experimentos realizados em reator tipo leito fixo utilizando as lipases Novozym® 435 e AK SiO ₂ -PVA.	87
Tabela 3.7 Condições para determinação dos ésteres de etila utilizando o CG Varian 3800.	94
Tabela 3.8 Condições para determinação dos ésteres de etila utilizando o GC-2010AF Shimadzu.	95
Tabela 4.1 Análise de BET/BJH dos biocatalisadores e suportes utilizados na imobilização das lipases.	97
Tabela 4.2 Concentração, velocidade específica de formação e rendimento dos ésteres etílicos no estado estacionário, obtidos nos ensaios realizados com a lipase AK SiO ₂ -PVA em reator tipo leito fixo.	127
Tabela 4.3 Concentração, velocidade específica de formação e rendimento dos ésteres etílicos no estado estacionário, obtidos nos ensaios realizados com a lipase Novozym® 435 em reator tipo leito fixo.	134
Tabela 4.4 Atividade das lipases antes do início e no final dos experimentos.	143
Tabela 4.5 Resumo dos resultados obtidos nos ensaios realizados em reator tipo tanque agitado com cesta e reator tipo leito fixo.	149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	atividade enzimática
AG	ácidos graxos
AGL	ácidos graxos livres
AK SiO ₂ -PVA	Lipase AK imobilizada no suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOCS	<i>American Oil Chemists Society</i>
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
B100	biocombustível formado por 100% de biodiesel
B5	biocombustível formado pela mistura de 5% de biodiesel e 95% de diesel
BET	modelo de Brunauer, Emmett e Teller
BJH	modelo de Barret, Joyner e Halenda
BSTR	<i>Batch Stirred Tank Reactor</i> , reator tanque agitado batelada
CLEAS	<i>cross-linked enzyme aggregates</i> , formação de agregados físicos
CLECS	<i>cross-linked enzymes crystals</i> , ligação cruzada utilizando enzimas cristalinas
CSTR	<i>Continuous Stirred-Tank Reactor</i> , reator tanque agitado contínuo
DAG	diacilglicerol
DNA	ácido desoxirribonucleico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

MAG	monoacilglicerol
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MeOH	metanol
MIPK	metil isopropil cetona
MME	Ministério de Minas e Energia
NC	número de cetano
P	coeficiente de partição
PCMCs	<i>protein-coated microcrystals</i> , micro cristais revestidos de proteína
PID	Controlador Proporcional - Integral - Derivativo
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
p-NPP	p-nitrofenilpalmitato
PVA	álcool polivinílico
SiO ₂ -PVA	suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico
TAG	triacilgliceróis ou triglicerídeos
Tecpar	Instituto de Tecnologia do Paraná
TEOS	tetraetilortossilicato
TMOS	tetrametilortossilicato

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	7
2.1 Biomassa como fonte de energia	7
2.2 Aspectos técnicos do biodiesel	9
2.3 Matérias-primas para a produção de biodiesel	15
2.3.1 Óleos e gorduras	15
2.3.1.1 O potencial do óleo de palma	20
2.3.2 Álcool	23
2.3.3 Catalisador	26
2.3.3.1 Lipases	28
2.3.3.2 Imobilização de enzimas	30
2.4 Produção de biodiesel por transesterificação	34
2.5 Especificações e qualidade do biocombustível	41
2.6 Biodiesel via catálise enzimática	45
2.6.1 Biodiesel via catalise enzimática em escala industrial ..	56
2.6.2 Biorreatores com enzimas imobilizadas	56
2.6.3 Exemplos de alcoólise enzimática do óleo de palma visando à produção de biodiesel	64
2.6.4 Processos contínuos de alcoólise enzimática de óleos e gorduras visando à produção de biodiesel	66
2.7 Considerações finais	74
3. Material e métodos	77
3.1 Material	77
3.1.1 Enzimas	77
3.1.2 Óleo vegetal	78
3.1.3 Reagentes	78
3.1.4 Equipamentos	79
3.2 Metodologia Experimental	80
3.2.1 Imobilização da lipase em SiO ₂ -PVA	80

3.2.1.1 Síntese do suporte	80
3.2.1.2 Ativação do suporte	80
3.2.1.3 Imobilização da lipase	80
3.2.2 Determinação da massa específica do sólido	81
3.2.3 Processo contínuo de produção de biodiesel	81
3.2.3.1 Calibração da bomba peristáltica	81
3.2.3.2 Cálculo do tempo espacial	82
3.2.3.3 Produção do biodiesel em reator tipo tanque agitado com cesta	82
3.2.3.4 Cálculo da velocidade específica de formação de ésteres etílicos produzidos no reator tipo tanque agitado com cesta	85
3.2.3.5 Produção do biodiesel em reator tipo leito fixo	86
3.2.3.6 Cálculo da velocidade específica de formação de ésteres etílicos produzidos no reator tipo leito fixo	88
3.2.3.7 Cálculo do rendimento	90
3.2.3.8 Cálculo da produtividade	91
3.2.3.9 Cálculo da constante de desativação e do tempo de meia vida	91
3.3 Métodos de análise	92
3.3.1 Atividade enzimática	92
3.3.2 Teor de umidade	93
3.3.3 Propriedades texturais dos biocatalisadores	93
3.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	93
3.3.5 Dosagem dos ésteres etílicos	93
3.3.6 Purificação dos ésteres	95
3.3.7 Viscosidade do biodiesel	95
4. Resultados e Discussão	97
4.1 Propriedades dos biocatalisadores	97
4.2 Processo contínuo de etanólise do óleo de palma em reator tipo tanque agitado com cesta	98
4.3 Processo contínuo de etanólise do óleo de palma em reator tipo leito fixo	109
4.4 Efeito do solvente	135
4.5 Produtividade em ésteres etílicos	138
4.6 Viscosidade do produto	141

4.7 Comportamento das lipases.....	142
4.8 Estabilidade das lipases.....	147
4.9 Considerações finais	148
5. Conclusão	151
6.Sugestão para trabalhos futuros	153
7. Referências Bibliográficas.....	155
Apêndice	185
A. Dados utilizados no cálculo do rendimento.....	185
B. Resultados da análise de BET	186
C. Cromatogramas dos ensaios realizados em reator tipo leito fixo e tanque agitado com cesta com a lipase Novozym® 435.	188
Anexo	191
A. Unidades de produção de biodiesel autorizadas para operação e unidades autorizadas para operação e comercialização	191
B. Especificação do biodiesel.....	196

1. Introdução

A crescente demanda mundial de derivados de petróleo, os efeitos ambientais de seu uso nas atividades industriais, de geração de energia e de transporte, além da forte expectativa de desabastecimento energético futuro, têm promovido uma verdadeira revolução no desenvolvimento e uso de energias alternativas.

Os óleos vegetais e gorduras animais aparecem como alternativas para substituição do óleo diesel em motores de ignição por compressão. Esta possibilidade foi reconhecida desde o início dos motores diesel, quando em 1911, Rudolph Diesel apresentou um motor com base na ignição por compressão utilizando óleo de amendoim em seu primeiro teste. O próprio inventor escreveu que o motor poderia ser abastecido com óleos vegetais e que esta possibilidade poderia ajudar no desenvolvimento da agricultura onde seriam utilizados estes motores. No entanto, estudos mostram que motores projetados para queimar óleo diesel sofrem com problemas relacionados à carbonização e depósitos nos bicos injetores e saídas de válvulas quando queimam óleos vegetais *in natura*. Ésteres de óleos vegetais são os melhores substitutos para o óleo diesel, pois não exigem qualquer modificação no motor diesel e têm um alto rendimento energético (Ramos, Kucek *et al.*, 2003; Pinto, Guarieiro *et al.*, 2005).

O biodiesel pode ser definido como sendo um monoalquil éster de ácidos graxos derivados de fontes renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais, obtidos por transesterificação, na qual ocorre a transformação de triglicerídeos em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos (Schuchardt, Sercheli *et al.*, 1998; Ramos, Kucek *et al.*, 2003).

A possibilidade do emprego de combustíveis de origem agrícola em motores de ciclo diesel é bastante atrativa tendo em vista o aspecto ambiental, por ser uma fonte renovável de energia e na destinação de resíduos agrícolas e agro-industriais, além do fato do seu desenvolvimento permitir a redução da dependência de importação de petróleo (Ramos, Kucek *et al.*, 2003; Pinto, Guarieiro *et al.*, 2005). O biodiesel permite que se estabeleça um ciclo fechado de carbono no qual o dióxido de

carbono (CO_2) é absorvido quando a planta se desenvolve e é liberado quando o biocombustível é queimado no motor. Em estudo realizado, em 1998 pelos Departamentos de Agricultura e de Energia dos Estados Unidos sobre a emissão de gás carbônico (CO_2) pelo biodiesel produzido de soja, desde a produção agrícola até a queima pelo motor, e do diesel de petróleo, da extração à combustão, as emissões de CO_2 pelo B20 e pelo B100 foram, respectivamente, 15,7% e 78,5% menores que as do óleo diesel derivado de petróleo (Silva e Freitas, 2008).

A Lei 11.097, de 13 de janeiro de 2005, introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira e desde 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel. O país está entre os maiores produtores e consumidores mundiais de biodiesel, a produção até novembro de 2010 foi de 2.171.614 m^3 . Atualmente, existem 66 unidades produtoras de biodiesel autorizadas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) para operação no país, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 15.696,64 $\text{m}^3 \text{dia}^{-1}$ (ANP, 2010a).

A tecnologia estabelecida para a produção industrial de biodiesel é baseada na transformação química (transesterificação) de óleos vegetais com metanol, usando catalisadores homogêneos (ácidos ou alcalinos) para promover a clivagem das moléculas de triglicerídeos e gerar uma mistura de ésteres de ácidos graxos. Apesar do elevado rendimento obtido por esta via, o metanol constitui um produto também fóssil (obtido do petróleo) e o uso dos catalisadores homogêneos gera problemas ao meio ambiente e requer inúmeras etapas de recuperação e purificação do produto final (Knothe, Gerpen *et al.*, 2006; Marchetti, Miguel *et al.*, 2007).

A substituição da catálise homogênea pela heterogênea surge como uma alternativa tecnológica interessante, pois atende à demanda por processos menos poluentes e mais seletivos em função das vantagens que os processos heterogêneos oferecem sobre os homogêneos clássicos: pouca ou nenhuma corrosão; fácil separação; poucos problemas com rejeitos; fácil manuseio e possibilidade de reutilização. Além disso, o uso de catalisador heterogêneo minimiza os problemas relativos às etapas finais de purificação do biodiesel, reduzindo a ocorrência das reações indesejáveis de saponificação e permite uma simplificação e

redução dos custos dos processos pela diminuição do número de operações associadas. Várias pesquisas recentes relacionadas à alcoólise de triglicerídeos envolvem o uso de catalisadores heterogêneos, como por exemplo, zeólitas básicas, óxidos e carbonatos de metais alcalino terrosos e enzimas, em particular lipases (Pinto, Guarieiro *et al.*, 2005; Marchetti, Miguel *et al.*, 2007).

A rota enzimática vem sendo investigada no país por diversos pesquisadores, incluindo os grupos de pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e da Escola de Engenharia de Lorena (USP - EEL) que vêm estudando a produção de biodiesel empregando biocatalisadores (lipase imobilizada) a partir de diferentes matérias-primas lipídicas, como os óleos de mamona, palma e babaçu e sebo bovino (Urioste, 2004; Cruz Jr., 2007; Moreira, 2007; Paula, Urioste *et al.*, 2007; Da Rós, 2009; Silva, 2009; Souza, 2010). Os resultados obtidos são promissores demonstrando que os produtos obtidos atendem às especificações exigidas pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis para uso como biocombustível (Moreira, Perez *et al.*, 2007).

O presente estudo tem como meta a consolidação dos conhecimentos adquiridos, buscando avaliar a reação de alcoólise enzimática em diferentes configurações de reatores, operando em regime contínuo. O modelo reacional (matéria-prima lipídica e álcool) foi selecionado com base nas pesquisas em fase de desenvolvimento pelos grupos de pesquisa envolvidos (UFSC e USP - EEL).

A motivação para a utilização do óleo de palma é por ser uma cultura com um dos maiores rendimentos de óleo por hectare, além de as características geográficas e climáticas do Brasil propiciar a produção desta oleaginosa. Já a seleção do etanol é devido à produção em larga escala no Brasil, além de ser um produto obtido de fontes renováveis, tornando o processo de obtenção de biodiesel totalmente independente do petróleo, promovendo, desta forma, a produção de combustível completamente agrícola (Veiga Filho, 2008).

Mesmo considerando algumas desvantagens técnicas existentes na produção do biodiesel pela rota etílica, como por exemplo, maior dificuldade de purificação, o biodiesel etílico possui uma viscosidade maior que o biodiesel metílico promovendo uma maior lubricidade em relação ao biodiesel

metílico. Além disso, o biodiesel etílico gera menor opacidade na fumaça que o biodiesel metílico, sua temperatura de combustão é menor, significando, entre outras coisas, uma redução nas emissões de óxidos de nitrogênio (NOx). Deste modo, é válido e estratégico qualquer esforço para se aperfeiçoar a rota etílica de produção de biodiesel.

Para o desenvolvimento desta tese foram empregadas duas preparações de lipase imobilizada: a lipase de *Pseudomonas fluorescens* adquirida na forma solúvel e imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (AK SiO₂-PVA) e a lipase de *Candida antarctica*, comercialmente imobilizada em suporte acrílico (Novozym® 435).

Diante das considerações apresentadas, este trabalho teve como objetivo estudar a reação de alcoólise enzimática do óleo de palma com etanol visando à produção de biodiesel em sistema contínuo. Dentre os objetivos específicos estão:

- Caracterizar texturalmente os biocatalisadores, Novozym® 435 e AK imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (SiO₂-PVA), quanto à área superficial, volume e diâmetro de poro.
- Construir e operar de forma contínua um biorreator tipo tanque agitado com cesta utilizando a lipase Novozym® 435.
- Construir e operar de forma contínua um biorreator tipo leito fixo utilizando as lipases Novozym® 435 e AK imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (SiO₂-PVA).
- Determinar a influência do solvente terc-butanol nos reatores tipo tanque agitado com cesta e leito fixo, em relação à produção de ésteres etílicos e estabilidade operacional do sistema.
- Determinar a influência do uso do surfactante Triton X-100 na produção de ésteres etílicos e na operação do reator tipo leito fixo em modo contínuo, utilizando as lipases Novozym® 435 e AK imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (SiO₂-PVA).
- Determinar o comportamento das lipases Novozym® 435 e AK imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (SiO₂-PVA), em relação à sua atividade enzimática nos experimentos realizados nos biorreatores

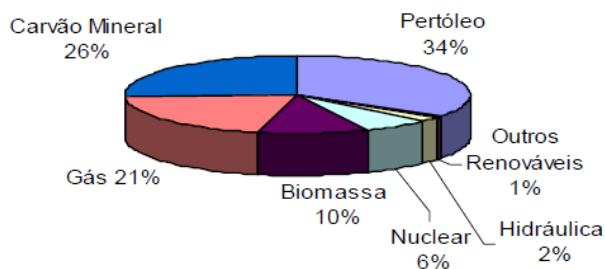
contínuos.

- Quantificar a viscosidade do biodiesel purificado e relacionar com o rendimento da reação de etanólise enzimática do óleo de palma.

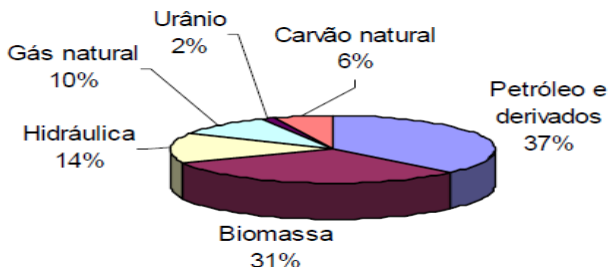
2. Revisão Bibliográfica

2.1 BIOMASSA COMO FONTE DE ENERGIA

A matriz energética mundial é composta por fontes não renováveis de carbono fóssil, como: petróleo, carvão e gás natural (Figura 2.1a). A possibilidade de esgotamento e escassez dessas fontes pode se tornar um dos principais problemas a serem superados pelo atual modelo de desenvolvimento sócio-econômico. No Brasil, há uma variedade de fontes primárias de energias renováveis, como a hidroeletricidade e as advindas da exploração da biomassa. A Figura 2.1b mostra a composição percentual da matriz energética brasileira. Juntas, as energias renováveis somam quase 45% do total produzido. Em contraste, na matriz energética mundial, este percentual é de apenas 12,7%.



(a)



(b)

Figura 2.1 Matriz energética (a) Mundial e (b) Brasileira.

Fonte: MME, 2009.

A pesquisa e o aperfeiçoamento da tecnologia para

incremento da matriz energética e a substituição gradual do petróleo é uma tendência mundial. Pode-se citar a energia eólica, as células de combustível, a energia solar e a biomassa como exemplos. Dentre essas fontes, destaca-se a utilização da biomassa principalmente para fins de uso como combustível.

Qualquer matéria orgânica que possa ser transformada em energia mecânica, térmica ou elétrica é classificada como biomassa. De acordo com a sua origem, pode ser: florestal (madeira, principalmente), agrícola (soja, arroz e cana-de-açúcar, entre outras) e rejeitos urbanos e industriais (sólidos ou líquidos, como o lixo) (ANEEL, 2008).

Historicamente a biomassa foi largamente empregada como fonte de obtenção de diversos materiais, tais como fibras, polímeros e combustíveis, e este interesse pode ser atribuído ao seu caráter renovável e sua ampla disponibilidade (Suarez, Meneghetti *et al.*, 2007). Com a expansão da indústria do petróleo, a biomassa perdeu sua importância, em função do desenvolvimento de materiais com propriedades diferenciadas, a custos competitivos (Van Der Walle, Buisman *et al.*, 1999). Em alguns segmentos, a biomassa manteve sua posição em razão da sua natureza renovável, ampla disponibilidade, biodegradabilidade ou baixo custo.

O constante aumento na demanda por fontes de energia, a ampliação da consciência ecológica e o esgotamento das reservas de petróleo de fácil extração, aliado a um possível desenvolvimento econômico-social, tem incentivado pesquisas no sentido de desenvolver novos insumos básicos de caráter renovável, para diversas áreas de interesse industrial. O que coloca a biomassa em uma posição de destaque, em razão da sua natureza renovável, ampla disponibilidade, biodegradabilidade e baixo custo (Schuchardt, Ribeiro *et al.*, 2001; Suarez, Santos *et al.*, 2009).

Pelas dimensões continentais e características climáticas e territoriais, o Brasil possui cerca de 25% da biodiversidade do mundo e, conseqüentemente, grande abundância de biomassa e resíduos agroindustriais. Esses fatores mostram a importância do desenvolvimento de bioprocessos no país, de forma a auxiliar no desenvolvimento de novos produtos e redução de custos de diversos processos biotecnológicos (Castiglioni, 2009).

O país possui uma longa e significativa experiência no uso de biomassa como fonte de energia, especialmente com o

desenvolvimento de tecnologia gerada no Pró-Álcool em 1975 e durante a implementação do Pró-Óleo em 1980. Com isso, o país adquiriu muitas informações tecnológicas e operacionais sobre o uso de biomassa em grande escala.

O Brasil insere-se oficialmente no mercado do biodiesel a partir do lançamento oficial do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) em 06 de dezembro de 2004, e do Marco Regulatório que estabelece as condições legais para a introdução do biodiesel na Matriz Energética Brasileira de combustíveis líquidos. Em 13 de janeiro de 2005 foi publicada a Lei 11.097, que dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira.

A busca pela inserção do biodiesel na matriz energética tem sido um dos focos de vários países e blocos comerciais. Esta intensificação do uso do biodiesel se alicerça num tripé: (1) ambiente (melhoria das condições climáticas por redução das emissões e utilização de CO₂ pela matéria-prima); (2) social (desenvolvimento rural associado à produção de matéria-prima); (3) energia (independência de fornecedores e consumidores produzindo sua própria energia) (Quintella, Teixeira *et al.*, 2009).

2.2 ASPECTOS TÉCNICOS DO BODIESEL

O uso de óleos vegetais *in natura*, como substitutos do óleo diesel, tem sido alvo de pesquisa e desenvolvimento há muitos anos. Apesar de estes óleos possuírem alto índice de cetano e elevado poder calorífico, diversos fatores contribuem para que a substituição em larga escala do óleo diesel, principalmente em motores de pequeno porte, ainda seja evitada. Motores projetados para queimar óleo diesel sofreriam com problemas relacionados à carbonização e depósitos nos bicos injetores e saídas de válvulas, quando queimassem óleos vegetais *in natura*, uma vez que suas moléculas contêm glicerina. Outros problemas relacionados à diluição do óleo lubrificante são a dificuldade de partida a frio, queima irregular, eficiência térmica reduzida, odor desagradável dos gases de descarga e emissão de acroleína (Costa, 2005 apud Torres, 2006). Oliveira (2004) cita que a acroleína é uma substância tóxica emitida a partir da queima da glicerina contida nos óleos vegetais.

A diferença de propriedades entre o diesel e os óleos

vegetais resulta, principalmente, da diversidade química entre essas duas substâncias. O diesel é constituído de hidrocarbonetos com número médio de 14 carbonos. Os óleos vegetais são triésteres de glicerina, ou seja, produtos naturais da condensação da glicerina com ácidos graxos, cujas cadeias laterais têm números de carbonos variando entre 10 e 18, com valor médio de 14, para os tipos de óleos mais abundantes. Além da presença do grupamento funcional do tipo éster, os óleos vegetais possuem massa molecular cerca de três vezes maior que o diesel, dependendo da espécie de oleaginosa (Costa Neto, 2002).

Propriedades como densidade, faixa de destilação, poder calorífico, viscosidade, ponto de fluidez e número de cetano são influenciadas por variações na composição química dos óleos. A potência máxima a ser atingida pelo motor em operação depende do poder calorífico do combustível. O índice de cetano define o poder de auto-inflamação e combustão do óleo e seu valor condiciona o desempenho global do motor, refletindo na partida a frio, ruído e gradiente de pressão (Costa Neto, Rossi *et al.*, 2000). O ponto de névoa corresponde à temperatura inicial de cristalização do óleo e a viscosidade a medida da resistência interna ao escoamento de um líquido. Estas constituem propriedades intrínsecas dos fluidos. A Tabela 2.1 apresenta as principais características dos óleos vegetais e do óleo diesel.

De acordo com a Tabela 2.1, os óleos vegetais apresentam poder calorífico e índice de cetano próximos ao diesel. Todavia os altos valores do ponto de névoa e da viscosidade inviabilizam o uso direto em motores do ciclo diesel. O ponto de névoa influencia negativamente o sistema de alimentação do motor, bem como o filtro de combustível, sobretudo quando o motor é acionado sob condições de baixas temperaturas. Os óleos vegetais até hoje investigados apresentam ponto de névoa superior ao do óleo diesel convencional. Além disso, os valores elevados de viscosidade dificultam principalmente o estágio inicial da combustão, ou seja, o processo de atomização do combustível nos bicos injetores, de cuja eficiência dependerá a potência máxima a ser desenvolvida pelo motor (Allen, Watts *et al.*, 1999). No entanto, a modificação química destes óleos gera produtos com propriedades fluidodinâmicas semelhantes as do diesel, na Tabela 2.2 são apresentadas as características físico-químicas de ésteres

etílicos obtidos a partir de diferentes óleos vegetais.

Tabela 2.1 Características físico-químicas de alguns óleos vegetais *in natura* e do óleo diesel.

Características	Tipo de óleo					Óleo diesel*
	Mamona	Babaçu	Palma	Soja	Pequi	
Poder calorífico (kcal kg ⁻¹)	8913	9049	8946	9421	9330	10950
Ponto de névoa (°C)	10	26	31	13	26	0
Índice de cetano	Nd	38	38-40	36-39	38	40
Densidade (25 °C)	0,9578	0,9153	0,9118	Nd	0,9102	0,8497
Viscosidade a 37,8 °C (cSt)	285	30,3	36,8	36,8	47,0	2,0-4,3
Destilação a 90% (°C)	Nd	349	359	370	Nd	338
Teor de cinzas (%)	Nd	0,03	0,01	Nd	0,01	0,014
Cor (ASTM)	1,0	0,5	1,0	Nd	2	2,0
Resíduos de carbono Conradson (%)	Nd	0,28	0,54	0,54	Nd	0,35

Nd = não determinado; * Especificação fornecida por Kalayasiri, Jeyashoke *et al.*, 1996.

Fonte: Costa Neto, Rossi *et al.*, 2000.

A transformação dos óleos vegetais em um éster de ácido graxo, popularmente conhecido como biodiesel, é uma forma de minimizar os problemas causados pela utilização de óleos *in natura* como combustível. O biodiesel é um combustível composto de mono-álquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (com ou sem duplas ligações), derivados de fontes renováveis, como óleos vegetais, gorduras animais e óleos ou gorduras residuais, obtidos pela reação de transesterificação com um álcool de cadeia curta.

Tabela 2.2 Características físico-químicas do biodiesel (ésteres etílicos) de várias espécies vegetais e do óleo diesel convencional.

Características	Origem do biodiesel					Óleo diesel*
	Mamona	Babaçu	Palma	Soja	Pequi	
Poder calorífico (kcal kg ⁻¹)	9046	9440	9530	9449	9590	10824
Ponto de névoa (°C)	-6	-6	6	1	8	1
Índice de cetano	Ne	65	Ne	45	60	45,8
Densidade (20 °C)	0,9190	0,8865	0,8597	0,8850	0,8650	0,8497
Viscosidade a 37,8 °C (cSt)	21,6	3,9	6,4	4,58	5,2	3,04
Inflamabilidade (°C)	208	Ne	Ne	178	186	55
Ponto de fluidez (°C)	-30	Ne	Ne	-7	5	Ne
Teor de cinzas (%)	0,01	0,03	0,01	0,006	0,01	0,014
Cor (ASTM)	1	0	0,5	2	1,0	2,0
Resíduo de carbono Conradson (%)	0,09	0,03	0,02	0,14	0,01	0,35

Ne = não especificado; * Propriedades determinadas pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar, Curitiba, PR).

Fonte: Costa Neto, Rossi *et al.*, 2000.

Verifica-se na Tabela 2.2 que as propriedades do biodiesel, independentemente de sua origem, assemelham-se ao do diesel mineral, eliminando principalmente os problemas referentes aos elevados valores de viscosidade e ponto de névoa apresentados pelos óleos vegetais. Desta forma, é possível sua utilização sem qualquer adaptação ou investimentos tecnológicos no desenvolvimento de motores. Adicionalmente a estas vantagens, o biodiesel apresenta, ainda, uma série de características favoráveis de ordem técnica, como por exemplo, o

baixo risco de explosão, que lhe confere grande facilidade de transporte e armazenagem (Moreira, 2007).

O processo mais desenvolvido tecnologicamente de produção de biodiesel é conhecido como transesterificação, em que o biodiesel é obtido a partir da reação do óleo vegetal com metanol ou etanol, na presença de um catalisador. O metanol tem sido o álcool mais empregado devido ao seu baixo custo e grande disponibilidade em países como EUA, Japão e países da Europa. O etanol, por ser disponível a baixo custo no Brasil, provavelmente será o álcool para o biodiesel nacional. Os produtos da reação de transesterificação do óleo vegetal são o biodiesel e a glicerina, cujo maior constituinte é o glicerol (Torres, 2006).

A transesterificação foi amplamente investigada, principalmente a cerca do desenvolvimento de catalisadores. Dentre a extensa lista de referências na literatura de estudos sobre transesterificação pode-se citar como base os trabalhos de Freedman *et al.* (1984) e Freedman *et al.* (1986).

O biodiesel pode ser produzido a partir de uma grande variedade de matérias-primas. Dentre elas têm-se os óleos vegetais (soja, caroço de algodão, palma, amendoim, colza, mamona, girassol, entre outros), as gorduras de origem animal (sebo) e o óleo ou gordura residual oriundos da indústria alimentícia e restaurantes. O fator geográfico é o de maior influência para a seleção, dentre as múltiplas possibilidades. Dependendo da origem e da qualidade da matéria-prima escolhida, mudanças no processo de produção são necessárias. Um exemplo é o uso de óleos cuja concentração de ácidos graxos livres (AGL) é alta, uma vez que estes não são transformados em biodiesel por transesterificação alcalina, que é o método convencional para a produção de biodiesel. Neste caso, as matérias-primas que contêm teores significativos de AGL requerem processamento distinto do empregado a óleos e gorduras refinadas. Assim, a esterificação ou remoção de AGL são de vital importância, porque estes componentes podem comprometer os motores e sistemas de combustível (Knothe, Gerpen *et al.*, 2006).

O biodiesel é miscível com o óleo diesel mineral em todas as proporções. Em muitos países tem sido usadas misturas de biodiesel com óleo diesel ao invés de diesel puro. A composição destas misturas é denominada por siglas, como B5,

a qual indica uma mistura de 5% de biodiesel com óleo diesel. O biodiesel puro é denominado como B100 (Van Gerpen, 2005; Knothe, Gerpen *et al.*, 2006).

A produção e a comercialização de biodiesel no Brasil estão em sua fase embrionária, visto que as bases produtivas, comerciais, logísticas e legislativas estão sendo organizadas. Pode-se dizer que, atualmente, a produção e a comercialização de biodiesel são realizadas pelas etapas ilustradas na Figura 2.2 (Carramenha, 2007).

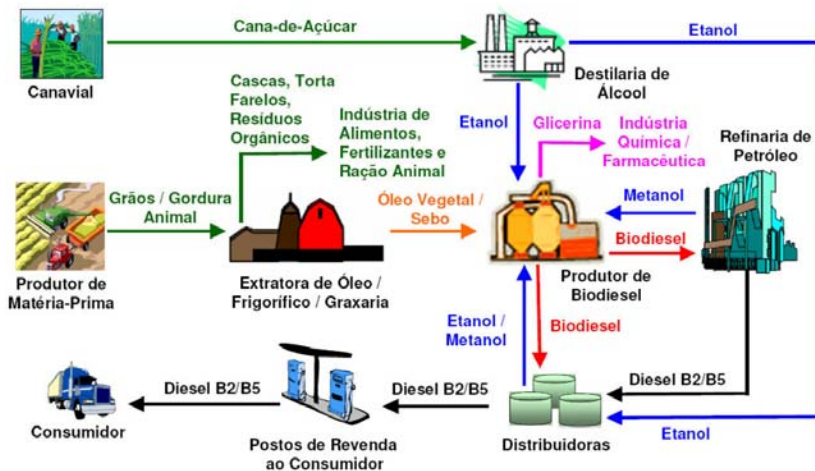


Figura 2.2 Cadeia produtiva e de comercialização do biodiesel no Brasil.

Fonte: Carramenha, 2007.

Atualmente, existem 66 unidades produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP para operação no Brasil, correspondendo a uma capacidade total autorizada de $16.216,47 \text{ m}^3 \text{ dia}^{-1}$. Destas 66 plantas, 57 possuem autorização para comercialização do biodiesel produzido, correspondendo a $15.341,94 \text{ m}^3 \text{ dia}^{-1}$. Há ainda 4 novas unidades produtoras de biodiesel autorizadas para construção e 8 unidades produtoras de biodiesel autorizadas para ampliação de capacidade. Com a finalização das obras e posterior autorização para operação, a capacidade total autorizada poderá ser aumentada em $2.216,71 \text{ m}^3 \text{ dia}^{-1}$. O Anexo A apresenta uma lista das plantas de biodiesel autorizadas para

operação e as autorizadas para operação e comercialização no Brasil (ANP, 2010b). A Figura 2.3 mostra a evolução da produção de biodiesel no Brasil desde 2005 (ANP, 2010c).

De modo geral, a diversidade de matérias-primas, processos e usos para o biodiesel é uma grande vantagem, mas traz consigo a responsabilidade de analisar, adequadamente, parâmetros (custo total envolvido na produção da matéria-prima, emissões no ciclo de vida, possibilidades de geração de emprego, disponibilidade de área e mão de obra adequada) que variam muito dependendo da escolha feita. Um destes parâmetros de grande importância é a especificação do combustível, que é fundamental para sua adequada introdução no mercado, devendo compatibilizar e harmonizar interesses muitas vezes contraditórios entre produtores do combustível, fabricantes de motores e de sistemas associados e órgãos ambientais, dentro de limitantes tecnológicos e condicionantes econômicos (Marville, Nogueira *et al.*, 2004).

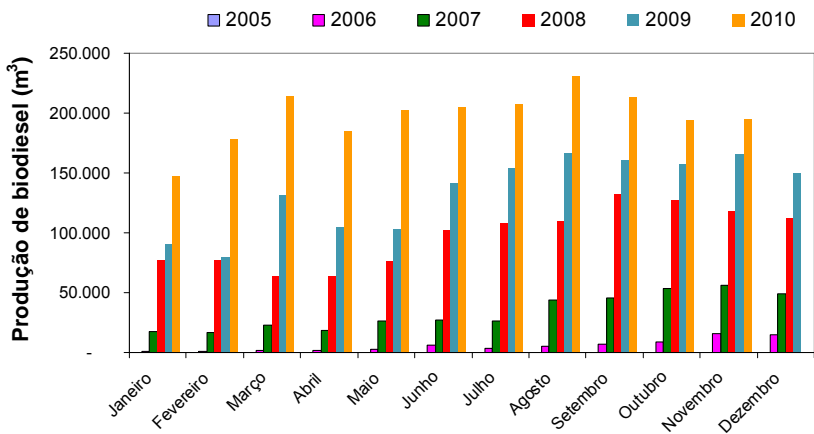


Figura 2.3 Produção de biodiesel no Brasil.

Fonte: ANP, 2010c.

2.3 MATÉRIAS-PRIMAS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

2.3.1 Óleos e gorduras

Os maiores componentes de óleos vegetais e gorduras animais são os triacilgliceróis (TAG, também denominado de triglicerídeos). Quimicamente, os TAG são ésteres de ácidos

graxos com glicerol (1,2,3-propanotriol o glicerol é muitas vezes chamado de glicerina). Os TAG de óleos vegetais e gorduras animais contêm diferentes tipos de ácidos graxos (AG). Assim, diferentes AG podem estar ligados a cadeia do glicerol. Os diferentes AG que estão contidos nos TAG revelam o perfil de AG (ou composição em AG) de óleos vegetais e gorduras animais. Como cada AG apresenta propriedades químicas peculiares, o perfil de AG é, provavelmente, o parâmetro de maior influência sobre as propriedades dos óleos vegetais e gorduras animais de onde se originam (Knothe, Gerpen *et al.*, 2006).

Os AG mais comumente encontrados nos óleos apresentam cadeias de 10 e 18 átomos de carbono. Essas cadeias podem ser saturadas ou insaturadas. Conforme a espécie de oleaginosa, variações na composição química do óleo vegetal são expressas por variações na relação molar entre os diferentes ácidos graxos presentes na estrutura. Portanto, a análise da composição de AG constitui o primeiro procedimento para uma avaliação preliminar da qualidade do óleo e/ou de seus produtos de transformação (Costa Neto, 2002).

Os TAG, necessários para a produção de biodiesel, são extraídos de fontes naturais (plantas oleaginosas e animais) e a partir de efluentes das atividades humanas (processos industriais e esgotos), conforme apresentado na Tabela 2.3.

É importante lembrar que toda a matéria-prima, dependendo da origem, deve sofrer um tratamento antes de ser utilizada, visando o rendimento máximo na produção. Os principais parâmetros que devem ser observados são a umidade e a concentração de ácidos graxos livres (Penteado, 2005). As propriedades químicas e físicas da matéria-prima estão diretamente associadas à tecnologia e ao rendimento do processo de conversão e, por conseguinte, à qualidade do produto final para fins combustíveis (Saraf e Thomas, 2007).

Em relação aos óleos vegetais, pode-se enumerar uma grande variedade de espécies oleaginosas. Observa-se, num primeiro momento, que a melhor matéria-prima para se investir na produção de óleo é a palma (Lora e Andrade, 2009). O rendimento de óleo por área plantada é o principal parâmetro utilizado para a escolha do tipo de oleaginosa. Entretanto, existem outros parâmetros que devem ser levados em conta, como a disponibilidade de matéria-prima na região escolhida

para a instalação da planta de biodiesel, considerando-se também os custos de produção e mão-de-obra. Esta análise resulta na escolha de espécies oleaginosas típicas da região onde a planta de biodiesel será instalada na medida em que as mesmas, na maioria dos casos, terão maior disponibilidade e preços mais baixos. Na Tabela 2.4 são apresentadas as principais culturas de oleaginosas praticadas no mundo e sua produção de óleo por hectare.

Tabela 2.3 Classificação das matérias-primas para a produção de biodiesel.

Tipo de matéria-prima	Origem Natural		Origem Residual	
	Óleos e gorduras animais	Óleos e gorduras vegetais	Óleos e residuais de frituras	Matérias graxas de esgoto
Fonte	Matadouros	Plantações agrícolas temporárias ou permanentes	Cocções comerciais e industriais	Águas residuais de centros urbanos e industriais
	Frigoríficos	Extrativismo		
Obtenção	Extração com água e vapor	Extração mecânica	Acumulações e coletas	Em fase de pesquisa e desenvolvimento
		Extração solvente		
		Extração mista		

Fonte: Carramenha, 2007.

A gordura animal é produzida a partir de bovinos, aves e suínos. O óleo de fritura residual é oriundo de restaurantes e empresas de gêneros alimentícios. Devido à abundância e aos baixos custos destas matérias-primas, a aplicação das mesmas na produção de biodiesel está sendo amplamente investigada (Moura, Gonçalves *et al.*, 2006; Moura, Silva *et al.*, 2006; Bhatti, Hanif *et al.*, 2008; Chung, Kim *et al.*, 2009; Feltes, Dors *et al.*, 2009).

Tabela 2.4 Produção de óleo de várias culturas de plantas oleaginosas.

Planta	Litros de óleo por hectare cultivado	Planta	Litros de óleo por hectare cultivado
Palma (dendê)	5710	Arroz	790
Macaúba	4310	Buffalo Gourd*	760
Pequi	3580	Açafrão	750
Buriti	3130	Crambe	670
Oiticia	2870	Gergelim	660
Coco	2580	Canola	560
Abacate	2530	Mostarda	550
Castanha do Pará	2290	Coentro	510
Macadamia	2150	Semente de abóbora	510
Pinhão Manso	1810	Euphorbia	510
Babaçu	1760	Avelã	460
Jjoba	1740	Linhaça	460
Pecan	1710	Café	440
Bacuri	1370	Soja	430
Mamona	1360	Cânhamo	350
Gopher Plant	1280	Caroço de algodão	310
Piassava	1270	Calendula	290
Oliveira	1160	Kenaf	260
Colza	1140	Semente de seringueira	240
Papoula	1110	Lupino	220
Amendoim	1020	<i>Erythea**</i>	220
Cacau	980	Aveia	210
Girassol	920	Castanha de caju	170
Tungue	900	Milho	170

* Tipo de semente de cabaceira, ** Espécie de palma

Fonte: Adaptado de Kurki, Hill *et al.*, 2006.

Outras matérias-primas não convencionais são os óleos e gorduras produzidos a partir de cultivo de micro-organismos (algas, fungos e bactérias) e esgotos urbanos (Wust, 2004; Miao e Wu, 2006; Mondala, Liang *et al.*, 2009; Huang, Chen *et al.*, 2010; Willson, Wiesman *et al.*, 2010).

O óleo de microalgas é o que mais tem atraído a atenção nos últimos tempos. Em comparação as oleaginosas tradicionais, os principais benefícios da produção de óleo de microalgas são: ele pode ser cultivado em terras não aráveis, como desertos, pântanos e oceanos. Portanto, não tem nenhum efeito sobre a produção de alimentos e tem o potencial para a produção de elevadas quantidades de óleo comparado as oleaginosas

tradicionais. A produtividade da biomassa é um parâmetro essencial para a avaliação econômica da produção de biodiesel de algas. Possíveis melhorias podem vir da engenharia genética e metabólica e utilização dos diferentes fotobiorreatores (Fu, 2009). No entanto, o uso destas matérias-primas ainda está em fase inicial de pesquisa e até o momento a sua utilização em escala industrial é inviável.

A Figura 2.4 apresenta as matérias-primas utilizadas no Brasil na produção de biodiesel no ano de 2010. Outras matérias-primas, citadas na figura, referem-se a: gordura de porco (0,01%), óleo de girassol (0,02%), óleo de fritura usada (0,18%), óleo de nabo forrageiro (0,33%) e outros materiais graxos (1,61%) (ANP, 2010b).

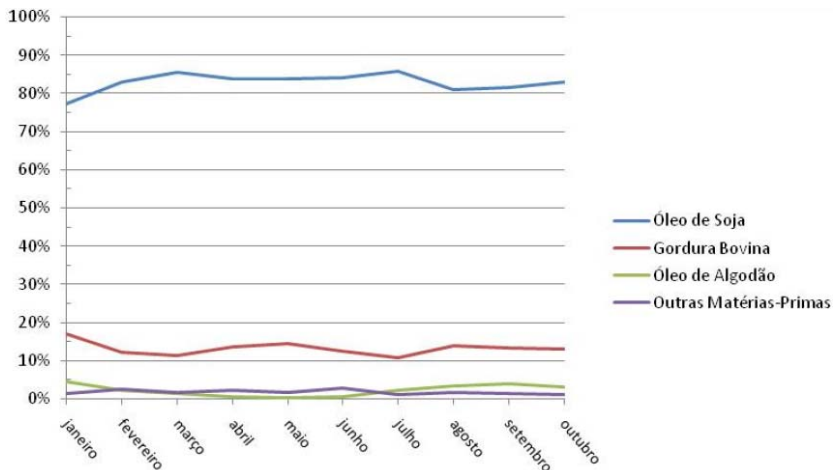


Figura 2.4 Principais matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel (janeiro a novembro de 2010).

Fonte: ANP, 2010b.

Devido à dimensão continental do Brasil e da sua diversidade de clima e solo, estima-se que existam aqui mais de 200 espécies de oleaginosas com potencial para produzir óleo como fonte de matéria-prima, para a produção de biodiesel. Entretanto a viabilidade de aplicação na produção industrial de biodiesel é restrita a algumas culturas. Basicamente, os parâmetros para a seleção de uma oleaginosa para a produção de biodiesel são o teor de óleo, a representatividade agrícola do

produto na região de aplicação e o conhecimento prévio dos métodos de cultivo (Macedo e Nogueira, 2004; Penteado, 2005; Carramenha, 2007).

2.3.1.1 O potencial do óleo de palma

O óleo de palma tem sua maior utilização na área alimentícia. Cerca de 80% da produção mundial é destinada a alguma aplicação alimentícia, os outros 20% restantes são para outras finalidades. Este óleo tem ampla difusão no mundo inteiro, graças ao seu baixo custo de produção, boa qualidade e ampla utilização. O óleo de palma ou dendê está em situação de destaque no mercado mundial, ocupando atualmente o 2º lugar, atrás apenas do óleo de soja, mas as perspectivas são para que ele venha a ocupar o 1º lugar já no início da próxima década (Óleo de palma, 2008).

Em 2009, foram produzidos 45 milhões de toneladas de litros de óleo de palma em todo o mundo, numa área de 12 milhões de hectares. Os dois maiores produtores globais são Indonésia e Malásia, com 20,9 e 17,9 milhões de toneladas, respectivamente. O Brasil, o 11º lugar na produção mundial é responsável por apenas 0,1%, com 80 mil hectares plantados. Dos 45 milhões de toneladas de óleo de palma produzidos mundialmente em 2009, cerca de 80% foram destinados à alimentação, 10% aos biocombustíveis e 10% à indústria química (Gebrim, 2010).

Para incentivar o desenvolvimento e, ao mesmo tempo, garantir que a produção de óleo de palma não prejudique a Floresta Amazônica, o Ministério da Agricultura, em parceria com o Ministério do Meio Ambiente e com a Casa Civil, lançou, em maio de 2010, o Programa de Produção Sustentável da Palma de Óleo no Brasil. Um dos destaques do programa é o mapeamento das áreas que podem ser usadas para o cultivo e a restrição do desmatamento. O Programa abrange os Estados da Amazônia Legal, e também os que mostram aptidão climática nas regiões Nordeste, como a Bahia, Alagoas, Sergipe e Pernambuco e ainda, o Espírito Santo e Rio de Janeiro no Sudeste. Dentro desse levantamento, foram priorizados para ser apoiadas pelo novo Programa, cerca de 31 milhões de hectares que já estão desmatados ou degradados e nos quais o dendê pode ser usado como reflorestamento, garantindo a

sustentabilidade dos plantios. Além disso, o programa também concede crédito, treinamento e possibilita o acesso dos produtores às novas tecnologias (Óleo de palma: O queridinho dos biocombustíveis, 2010).

As vantagens do cultivo da palma, enumeradas por pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Amazônia Ocidental (Embrapa), são muitas, sendo a rentabilidade o grande destaque. Dados da Embrapa do ano de 2000 mostraram que a palma produziu aproximadamente 30,57% de óleo em apenas 7,52% da área destinada para seu cultivo. Em comparação, a soja foi responsável por 35,85% da produção total usando 63,48% da área total de cultivo (Óleo de palma: O queridinho dos biocombustíveis, 2010).

Sob o ponto de vista do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o plantio racional da palma africana (dendezeiro) para a utilização do óleo de palma, como combustível substituto ou componente de óleo diesel na Amazônia, é a melhor opção, quando não se tem uma fonte confiável de oleaginosas nativas, pelas seguintes razões:

- propriedades físico-químicas do óleo similares ao óleo diesel;
- alta produtividade e potencial comprovado para produção em larga escala;
- produz o ano inteiro, o que permite menores volumes de estocagem e instalações industriais de menor porte; e,
- o Brasil, após 30 anos de pesquisa e plantio, tem tecnologia apropriada para aumentar a área plantada dessa cultura perene, que produz até 5 toneladas de óleo/hectare/ano.

A Embrapa iniciou em 2010, a produção de sementes híbridas de dendê, espécie desenvolvida a partir do cruzamento entre o dendezeiro de origem africana e o originário da região amazônica, o caiaué. Denominada BRS Manicoré, de acordo com a Embrapa, a nova semente possui características específicas, como maior resistência à ação de insetos e alta capacidade produtiva, o que a torna mais vantajosa tanto para uso na agricultura familiar quanto para utilização na produção de biodiesel e na indústria alimentícia. Ainda segundo a Embrapa, o óleo extraído do fruto da palma é o mais utilizado pela indústria de alimentos em todo o mundo, por ser o melhor substituto para

gordura hidrogenada, e rico em vitamina A e E. Também está presente nos produtos de higiene e limpeza, em lubrificantes e na produção de biocombustível (Richard, 2010).

A palma, também conhecido como dendê, é um cultivo tropical permanente que deve ser desenvolvido em zonas com temperatura média anual acima dos 24 °C, índice pluviométrico anual maior que 2500 mm, insolação de mais de 1500 horas ao ano, sendo que as áreas de cultivo devem ter boa drenagem, solo espesso e plano. Este é um cultivo que pode durar até 25 anos (Penteado, 2005; Carramenha, 2007).

Dos cachos de dendê podem-se extrair óleo das amêndoas e dos ramos, chamados de metacarpos. A Figura 2.5 ilustra o processo de extração que se inicia com a esterilização dos cachos da palmeira. Em seguida, os cachos devem ser cozidos para serem debulhados e passarem pelo processo de prensagem. O azeite do metacarpo e da amêndoa é extraído por processos separados. Do metacarpo é extraído o óleo de palma e da amêndoa é extraído o óleo de palmiste (Carramenha, 2007). A Figura 2.6 mostra a palmeira, o cacho e o fruto do dendê.

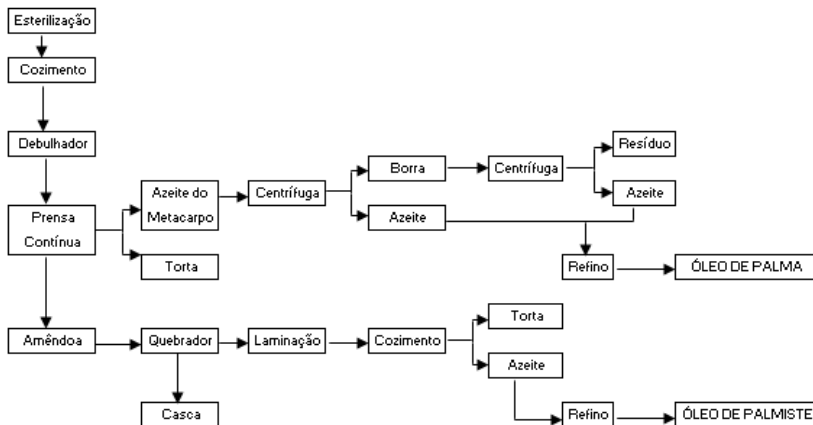


Figura 2.5 Método de extração do óleo de palma.
Fonte: Carramenha, 2007.

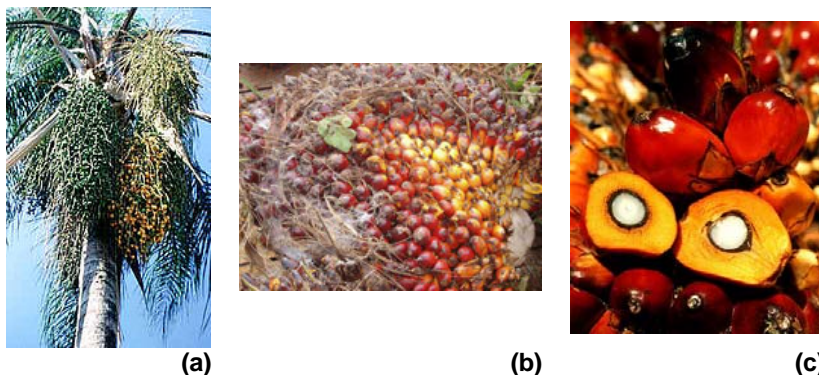


Figura 2.6 (a) Palmeira (b) Cacho de dendê (c) Fruto do dendê.
Fonte: Dendê, 2010.

O óleo de palma refinado apresenta-se na forma pastosa quando a temperatura ambiente, apresentando uma coloração esbranquiçada e quando líquido é um óleo de cor levemente amarelada. A Tabela 2.5 apresenta as características físico-químicas do óleo de palma refinado.

Tabela 2.5 Características físico-químicas do óleo de palma refinado.

Características físico-químicas	Limites (AOCS*)
Acidez (% Palmítico)	$\leq 0,05$
Índice de Peróxidos (mEq kg^{-1})	$\leq 1,0$
Cor Lovibond Red 5 $\frac{1}{4}$	$\leq 4,0$
Ponto de Fusão ($^{\circ}\text{C}$)	34 - 38
Índice de Iodo (wijjs)	51 - 55
Fósforo (ppm)	$\leq 3,0$
Sabor / Odor	Neutro
Densidade Relativa (50 $^{\circ}\text{C}$ /20 $^{\circ}\text{C}$)	0,891 – 0,899
Índice de Refração (nd/50)	1,454 – 1,456
Índice de Saponificação (mg g^{-1})	190 - 209
Matéria Insaponificável (%)	$\leq 1,2$

*AOCS: American Oil Chemists' Society.

Fonte: Agropalma, 2007.

2.3.2 Álcool

Os álcoois comumente utilizados para a produção de biodiesel são aqueles de baixa massa molecular e de cadeia curta como, por exemplo, o metanol e o etanol. Comparando o

uso do etanol e do metanol na produção de biodiesel percebe-se que a transesterificação etílica é mais complexa que a metílica. No entanto, trabalhando-se as quantidades estequiométricas relativas entre catalisador, álcool e óleo não transesterificado, bem como outras variáveis de processo como temperatura, agitação e tempo de reação, acredita-se ser possível atingir qualidade similar do produto obtido via rota metílica (Carramenha, 2007).

O metanol é o álcool predominantemente estudado e utilizado na reação de transesterificação; este processo é adotado em vários países. No Brasil, alguns grupos de pesquisa e pequenos produtores também utilizam a via metílica para produção de biodiesel (Schuchardt, Sercheli *et al.*, 1998; Pinto, Guarieiro *et al.*, 2005). Entretanto, o uso do metanol, um álcool tóxico, venenoso e de origem fóssil (derivado do petróleo) é uma das grandes desvantagens desse processo. Além disso, aproximadamente 50% do metanol consumido no país é importado. Uma alternativa interessante para o Brasil é a utilização do etanol obtido da cana-de-açúcar (maior produtor mundial de etanol), que é 100% renovável e garante maior segurança na manipulação devido à sua menor toxicidade.

Apesar de muitas pesquisas com biodiesel etílico já terem sido realizadas em diversas partes do mundo, todos os países que utilizam o biodiesel, o fazem via metílica. Isso ocorre porque na maioria desses países a disponibilidade de etanol derivado de biomassa é bastante reduzida. Assim, entre etanol e metanol fósseis, evidentemente, escolhe-se o mais barato e o mais reativo, ou seja, o metanol. A utilização de ambos os álcoois possui suas próprias vantagens e desvantagens, ficando a escolha por parte de uma análise de disponibilidade e dos objetivos a serem atingidos (Silva, 2008). A Tabela 2.6 apresenta um comparativo entre as vantagens e desvantagens da utilização do etanol ou metanol na obtenção de biodiesel.

Na produção de biodiesel, via catálise enzimática, quando o metanol é utilizado como aceptor de grupos acil, a enzima imobilizada pode sofrer inativação, devido ao efeito inibitório do metanol não dissolvido e do glicerol presente no meio de reação. Embora outros aceptores de grupos acil (álcoois), sem efeitos inibitórios, tenham sido estudados, o uso de metanol foi extensivamente pesquisado por seu baixo custo e disponibilidade (Ranganathan, Narasimhan *et al.*, 2008).

Tabela 2.6 Comparação entre as vantagens e desvantagens do uso do etanol e metanol na produção de biodiesel.

Metanol	
Vantagens	Desvantagens
O consumo de metanol no processo de transesterificação é cerca de 45% menor que o consumo do etanol anidro.	Apesar de poder ser produzido a partir da biomassa, é tradicionalmente um produto fóssil.
O preço do metanol é quase a metade do preço do etanol.	É bastante tóxico.
É mais reativo.	Maior risco de incêndios. Chama invisível.
Para uma mesma taxa de conversão, o tempo de reação utilizando o metanol é menos da metade do tempo de quando se emprega o etanol.	Transporte é controlado pela Polícia Federal, por se tratar de matéria-prima para extração de drogas.
Os equipamentos da planta operando pela rota metílica têm cerca de um quarto do volume dos equipamentos em comparação com a rota etílica, para uma mesma produtividade e qualidade.	A capacidade atual de produção brasileira de metanol só garantiria o estágio inicial de programa de âmbito nacional.
Etanol	
Vantagens	Desvantagens
Produção alcooleira no Brasil já é consolidada.	Os ésteres etílicos possuem maior afinidade com a glicerina, dificultando a separação.
Produce biodiesel com um maior índice de cetano e maior lubricidade, se comparado ao biodiesel metílico.	Possui azeotropia quando misturado em água, com isso sua desidratação requer maiores gastos energéticos e investimentos com equipamentos.
Se for feito a partir de biomassa produz um combustível 100% renovável.	Os equipamentos da planta com rota metílica têm cerca de um quarto do volume dos equipamentos em comparação com a rota etílica, para uma mesma produtividade e qualidade.
Gera ainda mais economia de divisas.	Dependendo do preço da matéria-prima, o custo de produção de biodiesel etílico pode ser até 100% maior que o metílico.
Não é tóxico como o metanol.	
Menor risco de incêndios.	

Fonte: Costa e De Oliveira, 2006.

Diversas pesquisas têm sido realizadas para investigar a metanólise com lipases imobilizadas para produção de biodiesel devido à fácil recuperação da lipase, reuso e resistência a solvente. A produção de biodiesel catalisada por lipase imobilizada geralmente é realizada em sistemas microaquosos e o efeito negativo do metanol na atividade da lipase é significativamente reduzido usando algum solvente hidrofóbico como hexano ou éter de petróleo no meio reacional (Chen, Du *et al.*, 2008).

Vários tipos de álcoois podem ser empregados na alcoólise catalisada por lipases. As lipases são conhecidas por terem a propensão a agir mais efetivamente em moléculas de cadeia carbônica longa do que de cadeia carbônica curta (Shimada, Sugihara *et al.*, 1997; Shimada, Sugihara *et al.*, 1998).

A opção de utilização de etanol no Brasil é bastante atrativa devido à grande capacidade agrícola e a já consolidada indústria do etanol no país. É natural a ideia de substituição do álcool metílico pelo etílico na produção de biodiesel. Além disso, o etanol apresenta a vantagem de não ser tóxico, ser biodegradável e ser produzido a partir de fontes renováveis. Mesmo considerando algumas desvantagens técnicas existentes na produção do biodiesel pela rota etílica como, por exemplo, maior dificuldade de purificação, o biodiesel etílico possui uma viscosidade maior que o biodiesel metílico promovendo uma maior lubricidade em relação ao biodiesel metílico. Destaca-se ainda que o biodiesel etílico gera significativamente menos opacidade na fumaça que o biodiesel metílico, sua temperatura de combustão é menor, significando, entre outras coisas, uma redução nas emissões de NOx (Da Rós, 2009). Deste modo, é válido e estratégico qualquer esforço para se aperfeiçoar a rota etílica de produção de biodiesel.

2.3.3 Catalisador

Biodiesel pode ser produzido pela reação de transesterificação de um triglicerídeo com um álcool na presença de um catalisador. Este catalisador pode ser um ácido, uma base ou uma enzima, e podem atuar em meio homogêneo ou heterogêneo.

A catálise alcalina é a mais utilizada em todo mundo. A produção industrial de biodiesel é, em sua quase totalidade,

conduzida por esta rota. A catálise ácida apresenta taxas de conversão de triglicerídeo inferiores aos obtidos na catálise alcalina e demanda quantidades maiores de catalisador e relações álcool / óleo mais altas. Os tempos de reação são mais longos e o consumo energético maior, visto que a maioria dos processos demanda aquecimento (Souza, 2006). O meio de atuação desses catalisadores é homogêneo, o que ocasiona certas dificuldades nos processos de purificação dos produtos e co-produtos obtidos, além de um alto gasto energético para o tratamento da água utilizada para a lavagem dos mesmos (Sakai, Kawashima *et al.*, 2009).

Processos na qual são utilizados catalisadores que atuam em meio heterogêneo têm sido largamente estudados (Georgogianni, Katsoulidis *et al.*, 2009). O meio heterogêneo propicia algumas vantagens decorrentes da fácil separação do catalisador do meio após a reação. Os catalisadores heterogêneos não são solúveis no meio reacional, evitando a etapa de neutralização e a consequente produção de resíduos e, principalmente, são reutilizáveis (Carramenha, 2007). Várias pesquisas recentes relacionadas à alcoólise de TAG envolvem o uso de catalisadores heterogêneos como, por exemplo, zeólitas básicas, óxidos e carbonatos de metais alcalino terrosos e enzimas, em particular lipases (Pinto, Guarieiro *et al.*, 2005).

Enzimas são catalisadores de reações químicas em sistemas biológicos *in vivo*, envolvendo reações com substratos naturais e não naturais *in vitro* (Faber, 1997). As enzimas são proteínas de elevada massa molecular, altamente específicas e apresentam elevado poder catalítico.

As enzimas, como toda proteína natural, são constituídas de uma ou mais cadeias de aminoácidos ligados covalentemente por meio de ligações peptídicas. A composição dos aminoácidos e a sequência destes na cadeia são características particulares de cada enzima, induzindo uma conformação tridimensional própria, essencial à atividade catalítica. Esta atividade é exercida pelo sítio ativo, que pode ser definido como a parte da estrutura da enzima que atua em contato direto com a substância (substrato) a ser transformada (Faber, 1997).

As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores mais usados em biotransformações (Faber, 1997), sendo de particular e grande interesse para o desenvolvimento deste trabalho, as lipases.

2.3.3.1 Lipases

Lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) são produzidas por micro-organismos (fungos e bactérias), animais e plantas. As suas preparações comerciais são obtidas principalmente a partir de fontes microbiana, devido aos baixos custos de produção e de fácil modificação das propriedades. Ambas as lipases, extracelulares e intracelulares, são utilizadas na produção de biodiesel, mas a maioria das pesquisas tem sido conduzida utilizando preparações comerciais de lipases extracelulares (De Castro e Anderson, 1995; De Castro, Mendes *et al.*, 2004; Antczak, Kubiak *et al.*, 2009).

As lipases verdadeiras são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG) fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres. Estas enzimas apresentam uma capacidade única de agir apenas na interface óleo/água. Esta definição exclui as enzimas que agem em ésteres solúveis em água (esterases) ou que hidrolisam outros lipídeos (acilidrolases, colesterolesterase, tioesterases e outras) (Brockman, Momsen *et al.*, 1988).

As lipases catalisam uma série de diferentes reações. Além de quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (síntese de éster). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados (Figura 2.7) (De Castro, Mendes *et al.*, 2004).

Uma das principais dificuldades na compreensão do mecanismo de hidrólise é a dependência da atividade das lipases das propriedades físicas da emulsão, ou seja, a disposição de substratos lipolíticos à lipase (Brockman, 1984 apud Mendes (2009)). O uso de substratos solúveis em água, tais como o p-nitrofenilpalmitato (p-NPP), cuja hidrólise é rápida e pode ser acompanhada espectrofotometricamente, não é, contudo, o mais adequado para a determinação da atividade da lipase, devido à interferência de esterases que podem intervir na medida da atividade (Erdmann, Vorderwerlbecke *et al.*, 1990 apud Mendes

(2009)).

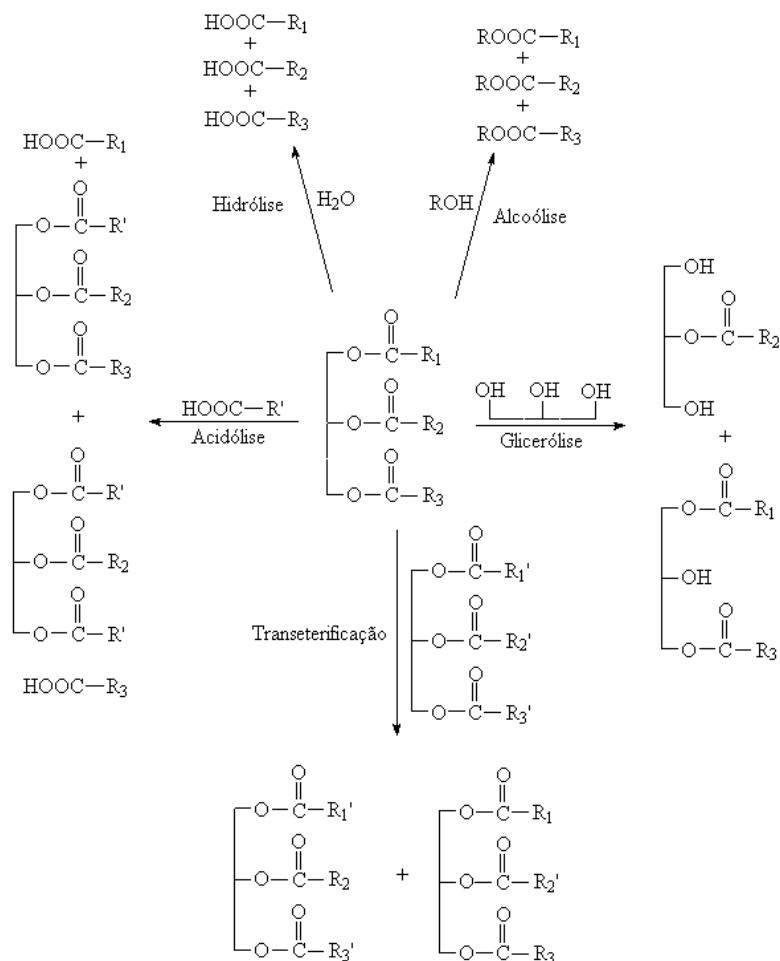


Figura 2.7 Representação esquemática das reações catalisadas por lipases a partir de um triacilglicerol.

Fonte: De Castro, Mendes *et al.*, 2004.

O método mais utilizado para determinar a atividade das lipases é a titulação dos ácidos graxos formados pela hidrólise do triglicerídeo, em geral, a trioleína, produzidos numa emulsão estabilizada com um agente tensoativo (Soares, De Castro *et al.*,

1999; Andrewes, Baldwin *et al.*, 2007; Foresti e Ferreira, 2007). Apesar do efeito dos agentes emulsificantes em lipases não ter sido extensivamente estudado, a goma arábica é o agente tensoativo mais utilizado, conduzindo elevada atividade lipolítica (Verger, 1997).

Apesar dessa versatilidade das lipases, seu mecanismo de atuação, ao contrário de outras enzimas, é bastante complexo e dependente de certas estruturas típicas das lipases. Além disso, o teor de água tem um efeito primordial no comportamento das lipases afetando, diretamente, a hidratação da enzima ou, indiretamente, alterando a natureza do meio de reação. Desta forma, a seleção das condições adequadas para a realização de uma reação enzimática catalisada por lipases deve seguir uma cuidadosa manipulação do meio-ambiente do biocatalisador, de tal forma que a produtividade do sistema seja maximizada por meio da total potencialidade da atividade enzimática. Isto pode ser alcançado pela utilização de solventes apropriados, controle do teor de água no meio reacional e imobilização da lipase.

2.3.3.2 Imobilização de enzimas

Para ser competitivo o uso de enzimas, a sua reutilização é uma necessidade, e apesar de boas produtividades serem reportadas em exemplos da literatura empregando enzimas livres, os experimentos são conduzidos em regime de batelada de uso único, sem tentativas de recuperação da atividade enzimática (Nielsen, Brask *et al.*, 2008). A imobilização consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, tornando o processo menos oneroso (Guisan, 2006). Desta forma, pode-se considerar que a vantagem fundamental das enzimas imobilizadas é que elas podem ser recuperadas e reutilizadas após um processo batelada, por filtração simples. Além disso, o empacotamento de enzimas imobilizadas em colunas permite uma fácil implementação do processo contínuo. Deve ser levado em conta que a imobilização da enzima tem um efeito benéfico na estabilidade da enzima, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima. A imobilização também auxilia na dispersão homogênea da enzima no meio, o que é essencial para a condução de reações enzimáticas em meio não aquoso (De Castro e Anderson, 1995;

Balcao, Paiva *et al.*, 1996; Villeneuve, Muderhwa *et al.*, 2000). As principais desvantagens deste processo são: alteração da conformação nativa da enzima, custo do suporte e perda de atividade durante o processo de imobilização (Arroyo, 1998).

Enzimas podem ser imobilizadas de muitas maneiras. Podem ser imersas em gel ou microcápsulas; podem ser adsorvidas em materiais insolúveis como resinas de troca iônica; podem ser copolimerizadas com algum monômero; podem se ligar a uma matriz polimérica insolúvel e ainda por ligações covalentes (Villeneuve, Muderhwa *et al.*, 2000; Dalla-Vecchia, Nascimento *et al.*, 2004). Diversos trabalhos encontrados na literatura tratam das diferentes técnicas de imobilização de lipases, caracterização dos complexos ativados e aplicações em reações que se processam em meio aquoso e não-aquoso, como os abordados nas revisões abrangentes publicadas por Jeganathan, Abang *et al.* (2008) e Ognjanovic, Bezbradica e Knezevic-Jugovic (2009) e nos capítulos publicados por Zanin e Morais (2004) e De Castro, Zanin *et al.* (2008).

A imobilização é considerada como uma abordagem para otimizar a performance operacional de enzimas em processos industriais, especialmente para sistemas não-aquosos. Várias abordagens têm sido utilizadas para a imobilização de lipases para a síntese de biodiesel, incluindo a adsorção (Noureddini, Gao *et al.*, 2005; Gao, Tan *et al.*, 2006), a encapsulação (Noureddini, Gao *et al.*, 2005), imobilização covalente em um suporte (Mahabubur, Talukder *et al.*, 2006), bem como a imobilização livre de suporte, por exemplo, granulados de enzima *cross-linked* (CLEAs) (Shah, Sharma *et al.*, 2006), cristais de enzima *cross-linked* (CLECs) (Lee, Vaghjiani *et al.*, 2000) e micro cristais revestidos de proteína (PCMCs) (Kreiner, Moore *et al.*, 2001; Kreiner, Fernandes *et al.*, 2005).

Estudos comparativos mostram diferenças acentuadas no desempenho de lipases imobilizadas nos vários suportes, e evidenciam que apesar das várias experiências reportadas na literatura, a imobilização de lipases ainda é um desafio complexo, uma vez que a extensão da imobilização depende da estrutura da enzima, método de imobilização, e do tipo de suporte. Em muitos casos, suportes que proporcionam uma elevada atividade e estabilidade da enzima apresentam sérias limitações de resistência mecânica e de queda de pressão, que os tornam inviáveis para a utilização em alguns tipos de reatores (Yahya,

Anderson *et al.*, 1998).

As mais recentes tecnologias de imobilização de enzimas requerem materiais com combinação de propriedades que não são encontradas nos materiais convencionais. Materiais híbridos orgânico-inorgânico são preparados pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos e constituem uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais, com uma larga faixa de aplicações.

Diferentes materiais naturais, sintéticos orgânicos, inorgânicos e híbridos com distintas características de tamanho, forma e densidade têm sido empregados para a imobilização de lipases. Entre esses, matrizes híbridas de natureza orgânica e inorgânica têm apresentado particular interesse comercial nos últimos anos, devido às suas diferentes características e aplicações. Diversos compostos orgânicos têm sido empregados na síntese destas matrizes, porém os biopolímeros se mostram promissores devido ao seu baixo custo, baixa toxicidade, biocompatibilidade e propriedades multifuncionais (Cazacu, Dragan *et al.*, 2003; Retuert, Quijada *et al.*, 2003; Shchipunov, 2003; Freitas, Da Ros *et al.*, 2009; Xie, Yu *et al.*, 2009; Simões, Mori *et al.*, 2010). Precursores silanos, tais como tetraetilortossilicato (TEOS) (Santos, Paula, *et al.*, 2008; Smitha, Shajesh *et al.*, 2008) e tetrametilortossilicato (TMOS) (Cazacu, Dragan *et al.*, 2003; Retuert, Quijada *et al.*, 2003) têm sido amplamente empregados na síntese de matrizes híbridas e a biocompatibilidade destes precursores com diversos polímeros, tais como álcool polivinílico (Freitas, Santos *et al.*, 2010), celulose (Xie, Yu *et al.*, 2009), carragenana (Shchipunov, 2003) e quitosana (Smitha, Shajesh *et al.*, 2008; Simões, Mori *et al.*, 2010).

Independentemente da estratégia utilizada para preparar uma matriz híbrida, o processo sol-gel é, indiscutivelmente, o mais empregado. O processo sol-gel envolve diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração de reagentes, entre outros. Estas variáveis determinam as características finais dos materiais, além disso, aditivos químicos podem ser usados para melhorar o processo e obter materiais com melhores propriedades, o que possibilita modificações nas propriedades mecânicas, controle de porosidade e ajuste no balanço hidrofílico/hidrofóbico (Gill e Ballesteros, 1998; Jose e Prado, 2005). Materiais sol-gel têm

sido empregados como suporte para a imobilização de enzimas tanto por encapsulação (Reetz, Zonta *et al.*, 1996; Soares, Dos Santos *et al.*, 2006) como por ligação covalente (Reetz, Zonta *et al.*, 1998; Bruno, De Lima *et al.*, 2004).

Recentemente, foi testada com sucesso uma matriz híbrida constituída de polissiloxano - álcool polivinílico (SiO₂-PVA) para imobilização de lipases de diferentes fontes: *Mucor miehei* (Bruno, De Lima *et al.*, 2004; Bruno, Coelho *et al.*, 2005), pancreática (Paula, Barboza *et al.*, 2005; Paula, Urioste *et al.*, 2007), *Pseudomonas fluorescens* (Moreira, Perez *et al.*, 2007; Santos, Paula, Nunes *et al.*, 2008), *Candida antarctica* (Freitas, Perez *et al.*, 2007; Paula, Moreira *et al.*, 2008), *Thermomyces lanuginosus*, *Burkholderia cepacia* e *Penicillium camembertii* (Moreira, Perez *et al.*, 2007; Freitas, Da Ros *et al.*, 2009; Freitas, Santos *et al.*, 2010).

A matriz híbrida SiO₂-PVA é obtida pela técnica sol-gel, a partir de tetraetilortossilicato (TEOS) e álcool polivinílico (PVA). O produto resultante, polissiloxano – álcool polivinílico (SiO₂-PVA) é um composto que combina atributos físico-químicos de material orgânico e inorgânico (Bruno, Coelho *et al.*, 2005). As vantagens da técnica sol-gel são a homogeneidade e pureza dos géis formados, bem como temperatura de síntese relativamente baixa. Esta técnica é um excelente método para preparação de materiais híbridos. A baixa temperatura da síntese possibilita que espécies orgânicas ou inorgânicas sejam incorporadas em uma matriz rígida de óxido de silicone sem que ocorra degradação (Barros, Almeida *et al.*, 2002). Por apresentar atributos híbridos, essa matriz (SiO₂-PVA) permite a manipulação da hidrofiliidade e hidrofobicidade, capacidade tamponante, condutividade elétrica, carga iônica, porosidade e propriedades mecânicas em geral (Gill e Ballesteros, 1998), bem como elevada atividade e estabilidade.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas duas lipases: a Novozym® 435 e a Lipase AK. A Novozym® 435 é uma lipase produzida por cultura submersa e adsorvida sobre resina acrílica. A lipase atua, não especificamente, nas 3 posições do TAG. Apresenta tamanho de partícula entre 0,3 e 0,9 mm, massa específica de aproximadamente 0,40 g mL⁻¹ e conteúdo de água entre 1 e 2%. É uma lipase termoestável com uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 70 e 80 °C (Novozymes, 2007). É descrita na literatura como o

biocatalisador mais efetivo para síntese de biodiesel a partir de diferentes óleos vegetais e diferentes agentes acilantes como metanol e etanol (Shimada, Watanabe *et al.*, 2002; Du, Xu *et al.*, 2004).

A Lipase AK é uma preparação enzimática produzida por um processo de cultura de uma estirpe selecionada de *Pseudomonas fluorescens* e tem uma alta atividade lipolítica. Esta lipase apresenta pH ótimo 8 e temperatura ótima de 60 °C. A solução de lipase AK é estável em uma ampla faixa de pH (4 a 10) e em temperaturas inferiores a 70 °C (Amano, 2008).

2.4 PRODUÇÃO DE BODIESEL POR TRANSESTERIFICAÇÃO

A utilização direta de óleos vegetais como combustível é insatisfatória e impraticável para uso em longo prazo devido à alta viscosidade e formação de ácidos graxos livres que resultam na formação de goma de oxidação, polimerização e deposição de carbono (Ranganathan, Narasimhan *et al.*, 2008). Sendo assim, os óleos vegetais são processados de modo a adquirir propriedades tais como viscosidade semelhante aos combustíveis fósseis; e os principais métodos empregados são a pirólise, a micro-emulsificação e a transesterificação.

Pirólise consiste na modificação química de óleos vegetais por craqueamento em altas temperaturas. Os óleos vegetais são craqueados para reduzir a viscosidade e melhorar o índice de cetano. Os produtos do craqueamento incluem alcanos, alcenos e ácidos carboxílicos. As principais desvantagens deste processo incluem o alto custo dos equipamentos e a necessidade de separar por destilação os subprodutos formados (Ma e Hanna, 1999).

Micro-emulsificação é outra técnica relatada para reduzir a viscosidade de óleos vegetais, e os componentes desta micro-emulsão incluem óleo diesel e outros derivados do petróleo, álcoois e surfactante em proporções adequadas. Álcoois como metanol, propanol e etanol são utilizados como aditivos para a redução da viscosidade, álcoois superiores são utilizados como tensoativos e alquil nitratos são usados para aumentar o índice de cetano. Apesar da redução da viscosidade e aumento do índice de cetano, a utilização de micro-emulsões provoca alguns problemas como entupimento do bico injetor e depósito de carbono por combustão incompleta (Ma e Hanna, 1999).

O método tradicional de produção de energia a partir de óleos e gorduras é a transesterificação com álcoois de cadeia curta, é o único método que resulta na formação de ésteres alquílicos de óleos e gorduras, comumente denominados biodiesel (Knothe, Gerpen *et al.*, 2006).

A reação de transesterificação de TAG com álcool pode ser representada pela equação geral ilustrada na Figura 2.8a. A Figura 2.8b contém as reações consecutivas e reversíveis que sofrem os triglicerídeos na transesterificação.

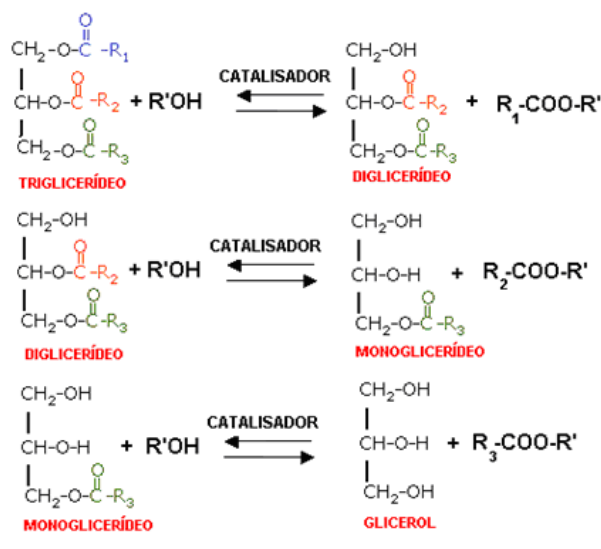
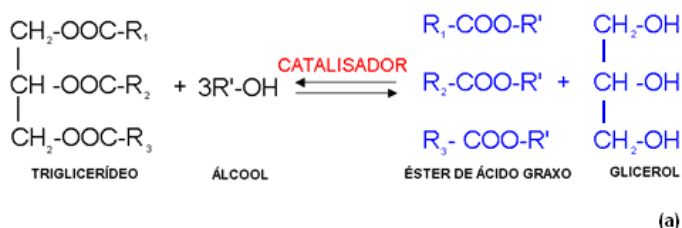


Figura 2.8 Transesterificação de triglicerídeos com álcool (a) Equação geral (b) Reações consecutivas e reversíveis.

Para que ocorra a reação é importante monitorar as três etapas consecutivas e a reversibilidade da reação. Na primeira etapa ocorre a conversão do TAG para diacilglicerol (DAG),

seguido pela conversão do DAG para monoacilglicerol (MAG), e do MAG para glicerol, fornecendo uma molécula de éster de cada glicerídeo a cada etapa. Os índices R_1 , R_2 e R_3 , mostrados na Figura 2.8, são hidrocarbonetos de cadeia longa, também chamados de ácidos graxos de cadeia longa, cuja composição varia de acordo com o tipo de óleo vegetal ou gordura animal utilizada. R' representa o tipo de álcool utilizado.

Di e monoacilgliceróis são formados como intermediários durante a reação de transesterificação. Em princípio, a reação de transesterificação é uma reação reversível, embora, durante a produção de biodiesel, a reação reversa não ocorra ou seja consideravelmente negligenciável porque o glicerol formado na reação não é miscível no produto, levando a um sistema de duas fases. A formação de glicerol a partir dos TAG procede por etapas através dos DAG e MAG, com uma molécula do alquil éster de ácido graxo sendo formada em cada etapa (Komers, Stloukal *et al.*, 2001; Knothe, Gerpen *et al.*, 2006).

A adição de solventes na reação de transesterificação acelera significativamente a velocidade da reação por aumentar a solubilidade do álcool no óleo vegetal. Esta medida foi proposta como alternativa para superar a miscibilidade limitada entre álcool e óleo, criando um sistema monofásico. No entanto, a razão molar álcool:óleo e outros parâmetros da reação são afetados pela adição de solventes. A necessidade de recuperação e reciclagem do solvente também contribui à complexidade deste procedimento, embora isto possa ser simplificado pela escolha de um solvente que apresente um ponto de ebulição próximo ao do álcool que se deseja utilizar (Knothe, Gerpen *et al.*, 2006).

Catalisadores químicos utilizados para a produção industrial de biodiesel (normalmente NaOH, KOH ou metóxido de sódio) fornecem uma conversão do óleo perto de 99% (Mittelbach, 1996; Ma e Hanna, 1999; Fukuda, Kondo *et al.*, 2001; Van Gerpen, 2005). Apesar desta excelente produtividade, a produção global de biodiesel é relativamente limitada, principalmente devido aos inconvenientes, tais como a necessidade de aplicação de óleos vegetais refinados, os problemas relacionados com a recuperação do glicerol (o principal subproduto) e formação de sabões, MAG, DAG e pigmentos. Os resíduos de todos esses subprodutos agravam a qualidade do biodiesel. Além disso, a concentração de ácidos

graxos livres (AGL) nos óleos vegetais utilizados na produção de biodiesel tem que ser inferior a 0,5%, uma vez que estes diminuem o rendimento de transesterificação (Meher, Sagar *et al.*, 2006), e só podem ser convertidos em ésteres com a utilização de um catalisador ácido. Outras desvantagens da catálise química incluem a necessidade de aplicação de grandes quantidades de álcool e completa remoção de água.

Nos países produtores de biodiesel, exceto o Brasil, devido ao metanol anidro ser relativamente barato, a produção industrial de biodiesel é limitado a síntese de metil ésteres de ácidos graxos. O álcool etílico produzido a partir de biomassa vegetal (Solomon, Barnes *et al.*, 2007) está disponível apenas com 95% de pureza e exige desidratação, por exemplo, antes da produção de biodiesel e este passo do processo aumenta os custos (Antczak, Kubiak *et al.*, 2009).

A Tabela 2.7 mostra uma comparação entre os diferentes processos de produção de biodiesel.

A necessidade de reduzir o custo do catalisador e do volume gerado de efluente, bem como promover uma purificação extensiva no produto, tem estimulado a investigação de métodos alternativos para a produção de ésteres. Algumas das desvantagens referidas nos processos químicos podem ser eliminadas na produção enzimática de biodiesel, catalisada por diferentes lipases e, portanto, processos enzimáticos são uma promissora alternativa aos processos químicos. A Figura 2.9 compara as diferentes operações requeridas para a produção química e enzimática de biodiesel utilizando metanol (MeOH) (Ranganathan, Narasimhan *et al.*, 2008).

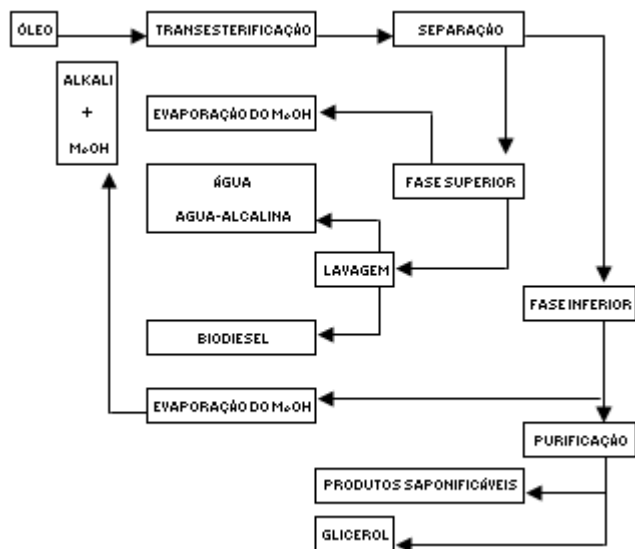
A produção enzimática de biodiesel tem sido geralmente conduzida em temperaturas entre 20 e 60 °C. Após a conclusão do processo de alcoólise, a fase inferior (glicerol), é simplesmente separada da fase superior (biocombustível), não sendo necessário processo de desodorização e neutralização do produto. Um pequeno excesso de álcool proporciona alto rendimento na produção do biodiesel, e o biocatalisador (lipase imobilizada) pode ser utilizado várias vezes. A alcoólise catalisada por lipase é aplicável aos óleos vegetais brutos e refinados, ácidos graxos livres presentes no óleo e óleos e gorduras residuais, e diversos álcoois, como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, e isobutanol podem ser utilizados. Concentrações mínimas de água no meio de reação podem ter

um impacto positivo sobre a produtividade de biodiesel. A concentração de AGL no óleo pode ser muito maior do que no caso de processos catalisados por catalisadores alcalinos. A produção enzimática de biodiesel pode ser efetuada em meios com presença ou ausência solvente orgânico (Antczak, Kubiak *et al.*, 2009).

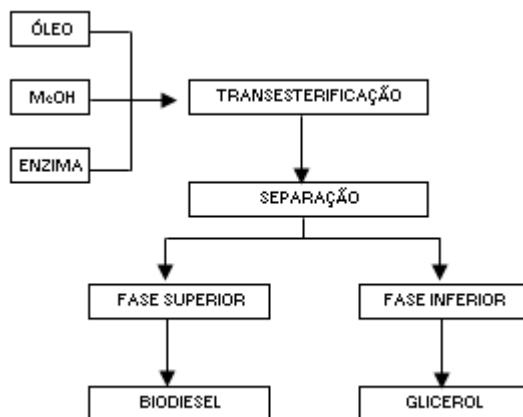
Tabela 2.7 Comparação entre diferentes tecnologias de produção do Biodiesel.

Variável	Catálise alcalina	Catálise ácida	Álcool supercrítico
Temperatura de reação (°C)	60-70	55-80	239-385
Ácidos graxos livres no material	Produto saponificável	Ésteres	Ésteres
Rendimento de ésteres	Normal	Normal	Bom
Recuperação do glicerol	Difícil	Difícil	
Purificação dos ésteres	Repetidas lavagens	Repetidas lavagens	
Custo de produção do catalisador	Barato	Barato	Médio
Variável	Catálise enzimática	Catálise Heterogênea	
Temperatura de reação (°C)	30-40	180-220	
Ácidos graxos livres no material	Ésteres		
Rendimento de ésteres	Alto	Normal	
Recuperação do glicerol	Fácil	Fácil	
Purificação dos ésteres	Fácil	Fácil	
Custo de produção do catalisador	Relativamente caro	Potencialmente barato	

Fonte: Adaptado de Helwani, Othman *et al.*, 2009.



(a)



(b)

Figura 2.9 Comparação entre (a) processo químico e (b) processo enzimático para a produção de biodiesel utilizando metanol.

Fonte: Ranganathan, Narasimhan *et al.*, 2008.

Comparado com métodos químicos que usam catalisadores alcalinos ou ácidos, a utilização de lipases como catalisadores para produção de biodiesel tem um grande

potencial. Ao utilizar um biocatalisador eliminam-se as desvantagens do processo químico, produzindo um produto de alta pureza com menos ou nenhuma operação a jusante para a recuperação de glicerol e na eliminação de catalisador e sal; e, ainda, os ácidos graxos livres nos óleos também são convertidos em seus ésteres correspondentes (Fukuda, Kondo *et al.*, 2001; Macedo e Macedo, 2004).

Os gargalos do processo enzimático incluem o alto custo das lipases em comparação aos catalisadores inorgânicos e a inativação das lipases por contaminações pela matéria-prima e por álcoois polares de baixa massa molar (Knothe, Gerpen *et al.*, 2006). De acordo com uma análise recente (Fjerbaek, Christensen *et al.*, 2009), o custo da enzima por kg de ésteres produzido ainda é maior quando comparado ao custo de catalisador alcalino (por kg de ésteres produzidos). Tem sido sugerido que o custo da lipase pode ser reduzido pelo uso da tecnologia do DNA recombinante. Ao mesmo tempo, a engenharia de proteínas pode ser usada para melhorar a estabilidade da lipase, especificidade ao substrato e eficiência catalítica, o que facilitará a redução do custo de todo o processo (Bornscheuer, Bessler *et al.*, 2002; Akoh, Chang *et al.*, 2007), além, é claro, do desenvolvimento de novos métodos e suporte para imobilização de enzimas.

A alcoólise enzimática tem a vantagem de permitir maior controle sobre a distribuição posicional dos AG no produto final, devido à seletividade e regioespecificidade das lipases. As aplicações atuais são reservadas a produtos de alto valor agregado, mas o desenvolvimento de processos mais econômicos tornará possível o emprego em produtos de maior consumo. Além disso, vem sendo muito utilizada em pesquisas científicas para explorar as relações entre estrutura e função de TAG, levando ao desenvolvimento de novos produtos (De Castro, Mendes *et al.*, 2004). Entretanto, as dificuldades associadas ao controle do processo e ao aumento de escala, bem como ao elevado custo das lipases, têm reduzido a aplicação industrial desses catalisadores para modificação de óleos e gorduras (Willis e Marangoni, 1999). Todavia, o procedimento de imobilização da lipase possibilita uma posterior reutilização do biocatalisador, o que pode tornar o processo viável sob o ponto de vista comercial e econômico (Villeneuve, Muderhwa *et al.*, 2000).

Embora, atualmente, a alcoólise enzimática não possa competir com a rota química, poderia, gradativamente, substituí-la devido ao crescente interesse pela utilização do biodiesel e os avanços no desenvolvimento da tecnologia. Desta forma, diversos resultados têm sido reportados em artigos e patentes. O aspecto comum desses estudos consiste na otimização das condições de reação (solvente, temperatura, pH, enzima, entre outros), visando estabelecer as características operacionais para aplicações industriais.

2.5 ESPECIFICAÇÕES E QUALIDADE DO BIOCOMBUSTÍVEL

Na Europa as especificações físico-químicas de qualidade para o biodiesel estão agrupadas na norma EN 14214, nos Estados Unidos são regulamentadas pela norma ASTM6751, enquanto no Brasil o mesmo é feito pela resolução ANP 07/2008 (Dabdoub, Bronzel *et al.*, 2009). A especificação brasileira é similar à européia e americana, com alguma flexibilização para atender às características de matérias-primas nacionais. Alguns itens possuem a informação anotar, significando que a ANP não estabeleceu um valor máximo ou mínimo. As especificações para o biodiesel B100, segundo as normas vigentes da ANP (2010d), estão apresentadas no Anexo B.

As especificações para o biodiesel podem ser divididas em: (i) relacionadas às características físicas e químicas e, algumas vezes, à qualidade da matéria-prima do biocombustível; (ii) relacionadas às etapas do processo de produção (conversão, separação e purificação dos ésteres, eliminação do excesso de álcool, entre outros tratamentos). Entretanto, alguns parâmetros podem estar relacionados tanto com o processo de produção quanto com as características da matéria-prima (Garcia, 2006).

- Propriedades dependentes da matéria-prima:

Viscosidade: A viscosidade é definida como a medida da resistência oferecida pelo fluido ao escoamento. Seu controle tem como objetivo permitir uma boa atomização do óleo e preservar sua característica lubrificante. A viscosidade deve ser tal que assegure o escoamento do produto do tanque até a câmara de combustão, execute a função de lubrificante do diesel em relação aos componentes do sistema de injeção e promova a boa pulverização do diesel injetado na câmara. A viscosidade

cinemática do biodiesel aumenta com o aumento da cadeia carbônica e é inversamente proporcional ao número de insaturações nela presentes. A presença de ácidos graxos e hidroxilas livres acarretam um aumento acentuado na viscosidade (Knothe e Steidley, 2005).

Número de Cetano: O número de cetano é o principal indicativo da qualidade de um combustível para motores do ciclo diesel; a qualidade de ignição de um combustível para máquina diesel pode ser medida a partir dessa propriedade. O tempo decorrido entre o início da injeção e o início da combustão é chamado de atraso de ignição. Este atraso é uma consequência do tempo requerido para que ocorra a pulverização, aquecimento e evaporação do combustível, sua mistura com o ar seguido das reações químicas precursoras da combustão e, finalmente, da auto-ignição da mistura. Quanto menor for o atraso, melhor será a qualidade de ignição do combustível. O número de cetano é obtido mediante um ensaio padronizado do combustível em um motor mono-cilíndrico, no qual se compara seu atraso com um combustível padrão de número de cetano conhecido. O combustível padrão é uma mistura equivalente de n-hexano (NC = 100) e alifmetilnaftaleno (NC = 0). Portanto, um combustível com NC = 45 tem a mesma qualidade de ignição que uma mistura dos padrões acima contendo 45% de cetano (Van Gerpen, Shanks *et al.*, 2004).

Ponto de Névoa e de Fluidez: A tendência à solidificação do combustível é avaliada a partir das propriedades relacionadas com a estabilidade ao frio, ou seja, o ponto de névoa (temperatura de cristalização dos componentes saturados do combustível) e ponto de fluidez (temperatura na qual o combustível não flui mais). Valores de ponto de névoa superiores à temperatura ambiente conduzem a dificuldades na partida do motor e a perdas de potência devido a obstruções das tubulações e filtros. A baixa estabilidade ao frio representa um inconveniente para a aceitação do biodiesel como combustível alternativo, especialmente em países de clima temperado. A melhora dessas propriedades leva à diminuição da temperatura inicial de cristalização dos componentes saturados e de solidificação do combustível, o que pode ser alcançado por meio de aditivos, pela mistura do biodiesel com óleo diesel ou misturas de ésteres graxos de álcoois ramificados com ésteres metílicos

(Van Gerpen, Shanks *et al.*, 2004; Knothe, Gerpen *et al.*, 2006).

Índice de Iodo: O índice ou valor de iodo é um parâmetro que determina a quantidade total de insaturações de um óleo ou de seus derivados. O índice de iodo é um dos parâmetros de identidade dos óleos e gorduras. O biodiesel apresenta índice de iodo semelhante ao dos triglicerídeos precursores do combustível (Garcia, 2006). Embora o índice de iodo determine a quantidade total de insaturações, esse não é um método adequado para fornecer informações sobre a estabilidade oxidativa do biodiesel, pois esse índice não discrimina os compostos que estão contribuindo para o valor encontrado (Ramos, Kucek *et al.*, 2003). Desse modo, há óleos diferentes com números de iodo semelhantes, porém, com estabilidades à oxidação consideravelmente distintas.

Estabilidade Oxidativa: A estabilidade oxidativa do biodiesel está diretamente relacionada ao grau de insaturação dos ésteres monoalquílicos presentes (Meher, Sagar *et al.*, 2006). A concentração de ésteres alquílicos com alto grau de insaturação varia de acordo com a matéria-prima utilizada na produção de biodiesel. Quanto maior o número de insaturações, mais susceptível está a molécula à degradação tanto térmica quanto oxidativa, formando produtos insolúveis que ocasionam problemas com a formação de depósitos e entupimentos do sistema de injeção do combustível no motor. Elevadas temperaturas e a exposição ao ar são fatores importantes que afetam a estabilidade do biodiesel, contudo esta é significativamente afetada quando estes dois fatores são conjugados (Ma e Hanna, 1999). A presença de água no biodiesel pode também promover a oxidação (oxidação hidrolítica), no entanto, em menor extensão.

Densidade: Os motores são projetados para funcionarem com combustíveis com uma determinada faixa de densidade, tendo em vista que a bomba injetora dosa o volume injetado. Variações na densidade levam a uma significativa variação na massa de combustível injetada, impossibilitando a obtenção de uma mistura de ar-combustível adequada, aumentando, assim, a emissão de poluentes como hidrocarbonetos, monóxido de carbono e material particulado (Garcia, 2006).

- Propriedades dependentes do processo de produção:

Acidez: O valor do índice de acidez pode aumentar com o tempo de estocagem, sendo agravado pela presença de água no combustível, devido às próprias condições de estocagem ou proveniente do processo produtivo (Garcia, 2006).

Corrosividade ao Cobre: Este parâmetro também monitora a presença de ácidos no combustível e, para o biodiesel, a não conformidade deste parâmetro pode estar ligada ao teor de ácidos graxos livres e ao processo de purificação da rota homogênea em catálise ácida (Van Gerpen, Shanks *et al.*, 2004).

Água e Sedimentos: A presença de água e sedimentos em níveis superiores aos prefixados é extremamente prejudicial ao biodiesel, pois além de acelerar a deterioração de tanques de estocagem e partes metálicas do motor diesel, também prejudicam a combustão. Destaca-se, ainda, que a presença de água durante a estocagem, além dos conhecidos problemas de corrosão, pode hidrolisar os ésteres favorecendo o crescimento de micro-organismos (Van Gerpen, Shanks *et al.*, 2004; Meher, Sagar *et al.*, 2006).

Resíduos de Carbono: A porcentagem de resíduos de carbono correlaciona-se com a quantidade de depósitos que podem ser deixados pelo combustível na câmara de combustão. Valores altos de resíduo de carbono podem levar à formação de uma quantidade excessiva de sedimentos na câmara de combustão e causar contaminação do óleo lubrificante por fuligem. A causa mais comum do carbono residual excessivo no biocombustível é o elevado nível de glicerina total, uma vez que estes contaminantes não são completamente queimados durante o processo de combustão (Van Gerpen, Shanks *et al.*, 2004). Ácidos graxos livres, sabões e polímeros também resultam em excesso de carbono residual.

Cinzas: O teor de cinzas é um indicador importante da quantidade de resíduos metálicos no biocombustível. A maior fonte deste resíduo é oriunda dos catalisadores geralmente empregados no processo (sódio ou potássio). A presença de fosfatídeos, ou seja, um refino incompleto do óleo vegetal é a principal fonte de fósforo no biodiesel. Teor elevado deste elemento pode acarretar uma não conformidade no teor de cinzas (Van Gerpen, Shanks *et al.*, 2004). Elevados teores de cinzas estão relacionados ao desgaste excessivo causado às

peças internas do motor diesel por forças de atrito e cisalhamento entre os metais.

Glicerol, mono, di e triglicerídeos: O teor de glicerina livre refere-se ao glicerol presente no combustível devido à separação incompleta das fases após o término da transesterificação. (Freedman, Butterfield *et al.*, 1986). Embora o glicerol seja insolúvel no biodiesel, esse subproduto pode permanecer suspenso no biodiesel ou ligeiramente solubilizado no combustível. Mono, di e triglicerídeos indicam que a reação de transesterificação foi incompleta. Como esses contaminantes são ésteres de glicerol, a soma dos três é denominada de glicerina ligada. Glicerina total é o somatório da glicerina livre e ligada (Van Gerpen, Shanks *et al.*, 2004). Triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, glicerina livre e glicerina total são parâmetros relativos à eficiência da rota sintética e purificação do biodiesel. Deste modo, as condições reacionais envolvidas na transesterificação devem ser muito bem otimizadas, bem como o emprego de etapas de lavagem do produto para garantir a remoção total desses contaminantes que produzem acroleína, um poluente cancerígeno, durante a combustão do biodiesel (Schuchardt, Sercheli *et al.*, 1998). Além disso, os mono, di e triglicerídeos interferem na viscosidade e nas propriedades de estabilidade a baixas temperaturas do combustível.

2.6 BIODIESEL VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA

A compreensão da produção enzimática de biodiesel e um sensível avanço na produção de preparações de lipases robustas, pode em breve resultar na substituição dos catalisadores químicos por enzimas. Fatores cruciais que afetam a produtividade dos processos enzimáticos na produção de biodiesel são apresentados na Figura 2.10. Para atingir a viabilidade econômica, matéria-prima adequada e a preparação de lipase devem ser escolhidas, sendo que esta pode ser modificada para melhorar a estabilidade e a eficiência catalítica. Estes passos são seguidos pela seleção de um solvente orgânico, a otimização da relação molar entre o álcool e o óleo, temperatura, teor de água, o pH do microambiente da enzima e a concentração de glicerol (Antczak, Kubiak *et al.*, 2009).

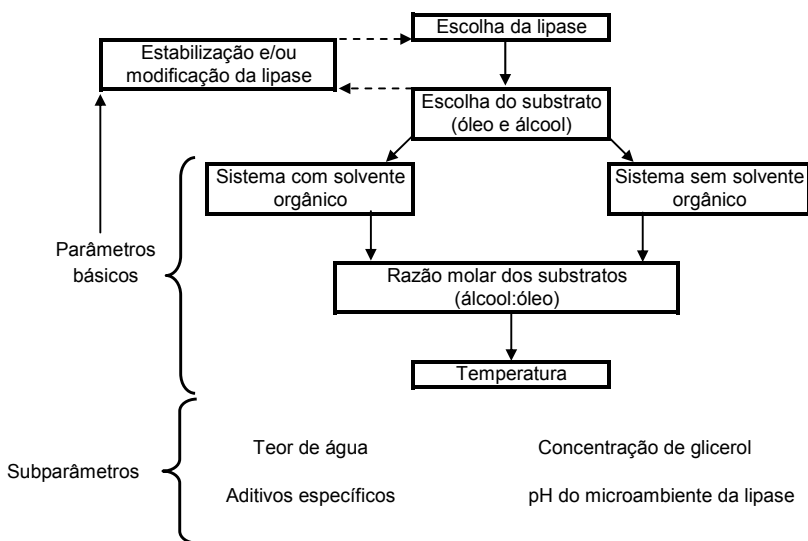


Figura 2.10 Parâmetros que afetam o rendimento da síntese enzimática de biodiesel.

Fonte: Adaptado de Antczak, Kubiak *et al.*, 2009.

- Seleção da lipase:

As características desejadas para que uma lipase possa ser utilizada na produção de biodiesel são: sua capacidade de utilizar os mono, di e triglicerídeos, bem como os ácidos graxos livre na alcoólise; baixa inibição, alta atividade e rendimentos em meios não aquosos; baixo tempo de reação, reutilização da enzima imobilizada, resistência à temperatura e ao álcool. Obviamente, que lipases de diferentes fontes têm diferentes propriedades adequadas para o processo (Bajaj, Lohan *et al.*, 2010).

A Tabela 2.8 relaciona algumas lipases utilizadas na produção de biodiesel na ausência e presença de solvente. A maioria delas são preparações comerciais de enzimas extracelulares, imobilizadas em diferentes suportes.

Tabela 2.8 Micro-organismos produtores de lipases utilizadas em estudos sobre a produção biodiesel, em sistemas contendo ou não solventes orgânicos.

Reação com solvente orgânico	Referência
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Dossat, Combes <i>et al.</i> (1999); Iso, Chen <i>et al.</i> (2001); Soumanou e Bornscheuer (2003); Devanesan, Viruthagiri <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Nelson, Foglia <i>et al.</i> (1996); Soumanou e Bornscheuer (2003); Nouredдини, Gao <i>et al.</i> (2005)
<i>Candida antarctica</i>	Nelson, Foglia <i>et al.</i> (1996); Royon, Daz <i>et al.</i> (2007); Shaw, Chang <i>et al.</i> (2008); Halim, Kamaruddin <i>et al.</i> (2009); Fu e Vasudevam (2009); Chen, Ju <i>et al.</i> (2011)
<i>Rhizopus delemar</i>	Nelson, Foglia <i>et al.</i> (1996)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Ma, Persson <i>et al.</i> (2002); Ghamgui, Karra-Chaabouni <i>et al.</i> (2004)
<i>Mucor miehei</i>	Nelson, Foglia <i>et al.</i> (1996); Al-Zuhair, Ling <i>et al.</i> (2007)
<i>Geotrichum candidum</i>	Nelson, Foglia <i>et al.</i> (1996)
<i>Candida rugosa</i>	Ma, Persson <i>et al.</i> (2002)
Reação sem solvente orgânico	Referência
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Dossat, Combes <i>et al.</i> (1999); Iso, Chen <i>et al.</i> (2001); Tongboriboon, Cheirsilp <i>et al.</i> (2010)
<i>Candida antarctica</i>	Nelson, Foglia <i>et al.</i> (1996); Watanabe, Shimada <i>et al.</i> (2002); Moreira, Perez <i>et al.</i> (2007); Talukder, Beatrice <i>et al.</i> (2008); Chang, Chen <i>et al.</i> (2009)
<i>Candida rugosa</i>	Shimada, Watanabe <i>et al.</i> (2002); Chowdary e Prapulla, (2002); Tongboriboon, Cheirsilp <i>et al.</i> (2010)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Ghamgui, Karra-Chaabouni <i>et al.</i> (2004)
<i>Mucor miehei</i>	Nelson, Foglia <i>et al.</i> (1996)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Soumanou e Bornscheuer (2003)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Iso, Chen <i>et al.</i> (2001); Soumanou e Bornscheuer (2003); Xu, Du <i>et al.</i> (2003); Du, Xu <i>et al.</i> (2003); Moreira, Perez <i>et al.</i> (2007)
<i>Aspergillus niger</i>	Haas, Piazza <i>et al.</i> (2002)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Abrigor, Uadia <i>et al.</i> (2000); Nouredдини, Gao <i>et al.</i> (2005)
<i>Burkholderias cepacia</i>	Hsu, Jones <i>et al.</i> (2004)

Fonte: Adaptado de Antczak, Kubiak *et al.*, 2009.

A especificidade das lipases utilizadas na produção de biodiesel refere-se à sua regioespecificidade e especificidade em relação ao comprimento da cadeia de hidrocarbonetos de ácidos graxos. Em termos de regioespecificidade, as lipases foram divididas em três tipos:

- *sn*-1,3-específica (hidrolisa a ligação éster nas posições R_1 ou R_3 do TAG);
- *sn*-2-específicas (hidrolisa a ligação éster na posição R_2 do TAG); e,
- não-específicas (não fazem a distinção entre as posições do éster a ser clivado).

A regioespecificidade das lipases pode ser afetada por vários fatores e alguns ainda não conhecidos. Sabe-se que esta propriedade depende da estrutura dos substituintes nas moléculas dos TAG (Antczak, Kubiak *et al.*, 2009).

A especificidade ao substrato consiste na capacidade de distinguir as características estruturais das cadeias acil, tais como: o comprimento, o número, a posição ou configuração de duplas ligações ou a presença de grupos ramificados, bem como a natureza da fonte acil: ácido graxo, alquil éster, glicerol éster, entre outros. Em reações de triacilgliceróis e álcoois as lipases distinguem o tamanho e tipo de ácido graxo contidos nos TAG, bem como o comprimento do álcool (Antczak, Kubiak *et al.*, 2009). Percebe-se que a seleção da preparação de lipase é de extrema importância para a produção de biodiesel a partir de diferentes matérias-primas renováveis.

- Seleção da matéria-prima:

Conforme descrito no item 2.3.1, as matérias-primas disponíveis para a produção de biodiesel são inúmeras dentre os óleos vegetais e os óleos residuais. Em relação aos álcoois utilizados para a produção de biodiesel temos: metanol, etanol, propanol, isopropanol, 2-propanol, n-butanol e isobutanol. O metanol e etanol são os mais utilizados devido à produção em grande escala e menor custo de obtenção. Entretanto, estes dois álcoois são agentes desnaturantes mais fortes que álcoois alifáticos de cadeia longa e podem inibir a ação das lipases. (Antczak, Kubiak *et al.*, 2009).

O rendimento global da reação catalisada por enzima depende da interação recíproca entre velocidade de reação e da velocidade de desnaturação enzimática. As maiores alíquotas

permitidas de álcool adicionadas para as misturas reacionais de alcoólise dependem da resistência da enzima à concentração do álcool e da água. A presença concomitante de metanol e água pode acelerar a desnaturação da enzima enquanto que, em sistemas contendo etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol, a presença de pequenas quantidades de água é necessária (Haas, Piazza *et al.*, 2002).

A estrutura e concentração de álcool afetam a estabilidade operacional das enzimas. A seleção do sistema de reação (presença ou ausência de solvente orgânico) se baseia na estabilidade operacional da enzima (geralmente solventes orgânicos, em certa medida, protegem as enzimas da desnaturação causada pelo álcool). Uma das vantagens da alcoólise enzimática consistiu na utilização de álcoois hidratados, que foram excluídos dos processos empregando-se catalisadores químicos, uma vez que nestes casos a presença de água leva a formação de subprodutos indesejáveis (Antczak, Kubiak *et al.*, 2009).

- Solventes:

A síntese enzimática de biodiesel pode ser efetuada na presença ou ausência de solventes orgânicos. Normalmente, em sistemas contendo solvente orgânico, as lipases catalisam a conversão de óleo em biodiesel quando a alíquota global de álcool é adicionada no início do processo. Em sistemas isentos de solventes, o álcool pode ser adicionado em várias pequenas porções para manter a sua concentração em níveis mais baixos para evitar a inativação da enzima (Ranganathan, Narasimhan *et al.*, 2008). Esta estratégia é amplamente empregada quando se utiliza metanol como doador de grupo acila, o que não é observado para os outros tipos de álcoois (Lu, Nie *et al.*, 2007; He, Xu *et al.*, 2008; Winayanuwattikun, Kaewpiboon *et al.*, 2008; Dizge, Aydinler *et al.*, 2009). Porém, em meios isentos de solventes orgânicos, a adição de todo álcool requerido no início da reação é também utilizada (Moreira, Perez *et al.*, 2007; Paula, Urioste *et al.*, 2007).

Sobre o papel do solvente orgânico e sua seleção, Laane, Boeren *et al.* (1987) concluíram que o critério fundamental, descrevendo a influência da polaridade e hidrofobicidade dos solventes orgânicos na catálise enzimática, foi o $\log P$, na qual P é o coeficiente de partição. O melhor

solvente orgânico garante aos substratos boa solubilidade e mantém a atividade enzimática. Em muitos casos, o melhor sistema para a reação enzimática é constituído por uma mistura de solventes orgânicos (Antczak, Patura *et al.*, 2004).

Solventes orgânicos são utilizados na produção enzimática de biodiesel a fim de aumentar a velocidade da alcoólise a partir de uma melhora mútua na solubilidade dos TAG hidrofóbicos e álcoois hidrofílicos. A solubilidade do propanol e butanol em óleos é muito maior do que a de metanol e etanol, e, portanto, estes dois primeiros álcoois não precisam de solvente orgânico adicional (Soumanou e Bornscheuer, 2003).

Fu e Vasudevam (2009) estudaram o efeito de diferentes solventes orgânicos na metanólise do óleo de canola catalisada pela Novozym® 435. Os dois principais obstáculos nas reações catalisadas por enzimas são: a imiscibilidade dos dois substratos, ou seja, o metanol hidrofílico e o triglicerídeo hidrofóbico, resultando na formação de uma interface conduzindo à resistência de transferência de massa, e a forte polaridade do metanol, que tende a tirar a água do sítio ativo da enzima levando a desativação. A adição de um solvente orgânico no sistema reacional pode superar simultaneamente as duas limitações, aumentando a solubilidade do óleo e metanol no solvente, e da limitação da concentração de metanol em torno da enzima. A Figura 2.11 mostra o micro ambiente de uma metanólise e o efeito da ausência e presença de solvente.

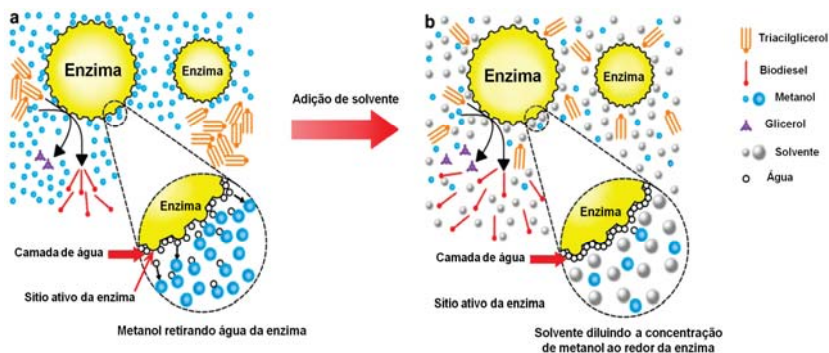


Figura 2.11 O micro ambiente da reação na ausência e presença de solvente.

Fonte: Fu e Vasudevam, 2009.

No trabalho de Fu e Vasudevam (2009), um total de vinte e oito solventes hidrofílicos e hidrofóbicos, a partir de sete grupos orgânicos (alcanos e cicloalcanos, acetona, éter, éster, álcool, nitrila e derivados), foram avaliados na alcoólise de óleo de canola. O iso-octano foi o solvente ideal por causa de sua hidrofobicidade e por possuir uma cadeia lateral em sua estrutura molecular com três grupos metílicos. Rendimentos relativamente altos do produto também foram obtidos com diversos solventes hidrofílicos que possuem alta miscibilidade com metanol, como dimetoxietano, metil iso-propil cetona (MIPK) e acetona.

Seis álcoois superiores (1-propanol, isopropanol, 1-butanol, iso-butanol, terc-butanol e iso-amilálcool) foram testados por Fu e Vasudevam (2009). Segundo os autores, esses seis álcoois não serviram só como solventes, mas também como aceptores de grupos acil na reação de alcoólise de triglicerídeos. De todos os álcoois testados, o terc-butanol foi o que favoreceu a metanólise. Isso pode ser atribuído ao impedimento estéreo, devido à presença dos três grupos metila laterais no terc-butanol em comparação a apenas um grupo metila no metanol. Outros estudos (Du, Liu *et al.*, 2007; Royon, Daz *et al.*, 2007) indicaram que terc-butanol é um excelente solvente na metanólise enzimática. No entanto, Fu e Vasudevam (2009) não concordam com esta conclusão, uma vez que o rendimento de éster metílico com base em terc-butanol (44,2%) foi muito menor do que com iso-octano (83,1%). O experimento foi repetido duas vezes e os rendimentos de ésteres metílicos foram 43,5% e 44,3%. Uma explicação é que cerca de 20% do óleo foi convertido para éster terc-butílico. A observação foi fundamentada em dois ensaios, só que como o objetivo do trabalho era selecionar um solvente para a metanólise sem que este participasse da reação, estes álcoois não foram selecionados como candidatos apropriados.

Considerando a alta atividade na reação com triglicérides, Fu e Vasudevam (2009) conduziram ensaios de alcoólise com os álcoois testados na ausência de metanol. Eles verificaram que os álcoois com cadeia lateral nas suas estruturas moleculares têm rendimentos mais altos de ésteres (> 90%) em comparação com os álcoois com cadeias lineares, com exceção do terc-butanol. Isso pode ser atribuído às diferenças na miscibilidade com triglicerídeos. Uma vez que para o álcool com o mesmo número de moléculas de carbono, os ramificados têm melhor miscibilidade com triglicérides que os isômeros lineares.

A principal razão da adição de solventes orgânicos às misturas óleo - álcool consiste em melhorar a solubilidade destes substratos e aumentar a estabilidade operacional das preparações de lipase. Solventes orgânicos eliminam a necessidade de adição de álcool em etapas (em particular o metanol que rapidamente inativa as proteínas enzimáticas). No entanto, a remoção destes solventes após a conclusão da reação também pode ser difícil. A volatilidade, inflamabilidade e toxicidade dos solventes orgânicos podem prejudicar a produção de biodiesel em escala industrial (Antczak, Kubiak *et al.*, 2009).

Seria tecnologicamente mais atrativo dispensar o uso de solventes orgânicos e realizar a reação enzimática apenas com a mistura dos materiais de partida. Esta possibilidade, se viável, combina a precisão da catálise biológica com os altos níveis de produtividade alcançados nos melhores métodos convencionais. Entre algumas das vantagens deste sistema cita-se a ausência de toxicidade e de inflamabilidade dos solventes orgânicos, redução do custo inicial do produto e fácil recuperação do produto sem as etapas de purificação ou evaporação (Selmi, Gontier *et al.*, 1997). Geralmente, pode-se prever algumas dificuldades imediatas para a implementação de um sistema isento de solvente, como a minimização de transferência de massa; homogeneidade do meio reacional; a mistura reacional deve ser e permanecer líquida durante o processo e devem ser adotadas estratégias que desloquem o equilíbrio no sentido da síntese (Mendes, 2009).

- Razão molar:

Na seleção da razão molar entre os materiais de partida (álcool e óleo), utilizados para a reação de alcoólise, o excesso molar de álcool sempre aumenta o rendimento da reação, mas também pode inativar a enzima, em particular, quando o álcool é insolúvel na mistura de reação. Metanol e óleos vegetais constituem uma solução quando a sua razão molar está próxima de 1:1 (40 °C). A adição de solventes orgânicos a essa mistura aumenta a solubilidade do álcool, portanto, ele pode ser usado em concentrações mais elevadas. Além disso, ele protege as enzimas da inativação e garante uma etapa na reação de alcoólise enzimática (Antczak, Kubiak *et al.*, 2009). Uma vez que, quando é utilizado excesso de metanol na ausência de solvente, a adição do álcool é realizada em etapas para se alcançar um

rendimento satisfatório.

A relação estequiométrica na reação de alcoólise são três moles de álcool para um mol de triglicerídeo com a subsequente formação de três moles de ésteres e um mol de glicerol. Nesta reação de equilíbrio é requerido excesso de álcool para formação dos produtos. Para a máxima conversão em ésteres, Tomasevic e Siler-Marinkovic (2003) mencionam que deveria ser usada razão molar de 6:1. Porém, altas razões molares de álcool:óleo vegetal podem interferir na separação do glicerol devido ao aumento da solubilidade do meio. A presença do glicerol em solução dirige o equilíbrio no sentido contrário à formação dos produtos, baixando, desta forma, o rendimento da reação (Meher, Dharmagadda *et al.*, 2006).

Elevados rendimentos na produção de biodiesel também podem ser alcançados utilizando concentrações estequiométricas de álcool e óleo. Shimada, Watanabe *et al.* (2002) observaram a inativação da lipase de *Candida antarctica* por metanol e etanol quando a razão molar álcool:óleo foi superior a 3:1. Nas reações de alcoólise, álcoois de cadeia curta têm um impacto negativo na estabilidade das lipases, e este efeito inibidor aumenta com a temperatura. Watanabe, Shimada *et al.* (2002) demonstraram o efeito negativo do metanol, etanol e n-propanol em diferentes temperaturas para Novozym® 435. Os resultados apontaram que para a utilização de metanol em temperaturas superiores a 30 °C, a enzima foi parcialmente inativada, enquanto que etanol e, especialmente, n-propanol forneceram melhores resultados. O efeito inibidor dos álcoois na atividade das lipases parece diminuir com o aumento da massa molecular do álcool e tem sido relatada uma aparente relação entre a solubilidade do álcool no óleo e o efeito desestabilizante do óleo (Nielsen, Brask *et al.*, 2008).

A melhor razão molar entre os materiais de partida utilizados na produção enzimática de biodiesel tem que ser determinada separadamente para um dado sistema: álcool - óleo - lipase. Normalmente, em sistemas com solvente orgânico, um ligeiro excesso de álcool é necessário para alcançar um rendimento satisfatório do processo de alcoólise. Em sistemas livre de solvente, o álcool deve ser adicionado na mistura de reação em sucessivas e pequenas porções (Antczak, Kubiak *et al.*, 2009).

- Temperatura:

A temperatura ótima de atividade das diferentes lipases utilizadas para alcoólise de óleos com metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol em hexano varia entre 30 e 55 °C (Haas, Piazza *et al.*, 2002). Temperaturas ótimas de reações de alcoólise catalisadas por diferentes lipases em sistemas livres de solvente estão no mesmo intervalo (entre 30 e 55 °C).

Du, Xu *et al.* (2003) observaram a relação similar entre a temperatura, velocidade e estabilidade da alcoólise da lipase *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) em repetidas bateladas. O aumento na temperatura de 30 para 40 °C acelerou a reação, mas também diminuiu (em cerca de 50%) a estabilidade da enzima em repetidas bateladas, enquanto que a 30 °C quase 90% da atividade enzimática foi mantida depois de 10 bateladas sucessivas. Também outros estudos, realizados em razão molar álcool:óleo de 0,75:1 (sistema livre de solvente) mostrou que 30 °C foi a melhor temperatura de processo. A velocidade de reação não foi aumentada quando a temperatura foi elevada para 50 °C e uma diminuição na temperatura para 25 °C resultou em uma menor velocidade de reação.

A temperatura ótima para alcoólise enzimática resulta da interação entre a estabilidade operacional do biocatalisador e a velocidade de reação. Depende também da razão molar álcool:óleo, tipo de solvente orgânico e termoestabilidade da preparação enzimática.

- Teor de água:

É necessário um baixo teor de água na fase oleosa para promover a reação de alcoólise com elevada conversão. Entretanto, a remoção de água do meio reacional deve ser equilibrada, pois uma atividade de água muito baixa pode acarretar a inativação do biocatalisador. A lipase Novozym® 435 tem demonstrado trabalhar sob concentrações de água menores que outras lipases (Shah e Gupta, 2007). Estudos mostraram que a adição de uma pequena alíquota de água à mistura de reação catalisada por enzimas (esta alíquota não pode transferir a reação de equilíbrio em favor da hidrólise) aumentou a taxa de síntese de ésteres de ácidos graxos (Iso, Chen *et al.*, 2001; Kaieda, Samukawa *et al.*, 2001; Nie, Xie *et al.*, 2006; Shah e Gupta, 2007).

O desenvolvimento da catálise em meio orgânico evidenciou que a quantidade de água realmente necessária para propiciar a atividade enzimática é muito pequena. Portanto, a existência de uma fase aquosa definida, mesmo que em pequena proporção, não é um pré-requisito para a eficiência da catálise, ou seja, a concentração de água requerida é somente para a atividade catalítica da enzima (Dalla-Vecchia, Nascimento *et al.*, 2004).

- Glicerol:

Resultados de estudos sobre o efeito do glicerol sobre a eficiência da alcoólise indicam que enzimas são inativadas, particularmente em processos contínuos e bateladas repetidas (bateladas repetidas são catalisadas pela mesma preparação de enzima). Dossat, Combes *et al.* (1999) e Du, Xu *et al.* (2003) observaram a considerável queda na atividade de lipases imobilizadas em matrizes hidrofílicas quando expostas a glicerina. Os autores descobriram que moléculas de glicerol foram adsorvidas na superfície dos suportes, formando um revestimento hidrofílico na enzima que tornou inacessíveis às moléculas de substratos hidrofóbicas. Adição de outra substância hidrofílica, como acetona ou de sílica gel na reação, remove parcialmente o glicerol da lipase (a partir da absorção em sílica gel), e isto levou a uma alcoólise eficiente. Du, Xu *et al.* (2003) notificaram também que a lavagem de lipase imobilizada com álcool iso-propílico restaura sua atividade desde que o glicerol tenha sido removido do suporte.

Outra abordagem para neutralizar a influência negativa do glicerol foi proposta por Li, Du *et al.* (2006). O biodiesel foi produzido usando as preparações de lipases de Lipozyme TL IM (lipase de *Thermomyces lanuginosus*) e Novozym® 435 (lipase de *Candida antarctica*). A reação de alcoólise do óleo de colza com metanol foi realizada com um solvente orgânico relativamente hidrofílico (terc-butanol). O terc-butanol é um solvente bom não só para o glicerol, mas também para o metanol e, portanto, este último não desnaturou as enzimas. A lavagem com terc-butanol e 2-propanol foi proposto por Chen e Wu (2003) como um método eficiente de regeneração da lipase imobilizada de *Candida antarctica* (Novozym® 435).

2.6.1 Biodiesel via catalise enzimática em escala industrial

A China foi o primeiro país a aplicar a catálise enzimática na produção de biodiesel em escala industrial. Em 2006, a empresa *Shanghai Lvming Environmental Protection Technology Co., Ltd.* estabeleceu uma linha de produção de biodiesel via catálise enzimática em Xangai. A fábrica emprega a técnica desenvolvida pela Universidade de Tecnologia Química de Pequim, utilizando, como catalisador, a lipase imobilizada de *Candida* sp. 99-125 e óleo residual de cozinha como matéria-prima. A dosagem da enzima é de 0,4% em relação à massa de óleo. O processo é realizado em um reator tipo tanque agitado, e uma centrífuga é usada para separar água e glicerol. Rendimentos de 90% de ésteres foram atingidos nas condições ótimas. O custo da lipase foi de 200 CNY/tonelada de biodiesel, ou seja, 30,33 USD/tonelada de biodiesel¹. A capacidade produtiva projetada para a empresa é de 20.000 tonelada/ano. A outra empresa que utiliza a catálise enzimática na produção de biodiesel na China, desde 2005, é a *Hunan Rivers Bioengineering Co., Ltd.*, localizada na província de Hunan. A empresa utiliza a tecnologia da Universidade de Tsinghua, usando a lipase comercial Novozym® 435. A capacidade produtiva projetada da empresa é de 10.000 tonelada/ano (Tan, Lu *et al.*, 2010; Tan, Shang *et al.*, 2010).

2.6.2 Biorreatores com enzimas imobilizadas

O biorreator é o coração do processo biotecnológico, sendo o equipamento em que os substratos são convertidos nos produtos desejados sob a ação de micro-organismos, células ou enzimas. Embora os biorreatores com biocatalisadores imobilizados sejam derivados dos biorreatores "clássicos" e, portanto, as características de construção e funcionamento serem bastante semelhantes, os biorreatores com biocatalisadores imobilizados se destacam em função das vantagens oferecidas pela utilização de micro-organismos, células ou enzimas imobilizados. Estas vantagens incluem o aumento das forças de resistência química, térmica e ao

¹ Valor convertido segundo cotação de 14/01/2011 (1 CNY = 0,15164 USD).

cisalhamento dos biocatalisadores, o aumento do número de ciclos repetidos da biossíntese com as mesmas partículas de biocatalisadores, fácil recuperação final dos biocatalisadores e diminuição da inibição dos processos (Baltaru, Galaction *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de um sistema com enzima imobilizada, para aplicação comercial, envolve uma série de decisões e ajustes que começam com a escolha do suporte para imobilização da enzima e termina com a decisão sobre o modo de funcionamento. Cada etapa é dependente uma da outra, e todas as etapas influenciam a economia global do processo final. O conhecimento da cinética da reação é necessário para atingir a qualidade desejada do produto e reduzir custos, além de compreender o comportamento cinético, é preciso elaborar uma estratégia operacional adequada para produzir a maior quantidade de produto ao menor custo, mantendo a produtividade constante ao longo do tempo (Weetall e Pitcher, 1986).

Os biorreatores utilizando biocatalisadores imobilizados podem ser concebidos como colunas, agitados, *airlift* ou com membrana. Eles são operados em batelada, sistema contínuo ou semicontínuo, com leito fixo, móvel ou agitado, expandido ou de leito fluidizado (Baltaru, Galaction *et al.*, 2009).

As características de um biorreator devem compreender simplicidade de concepção, flexibilidade, segurança de operação e possibilidade de monitoramento e controle de parâmetros operacionais. A concepção do biorreator requer um conhecimento adequado da cinética reacional, da hidrodinâmica do sistema e dos mecanismos de transferência de massa. No caso de bioconversões em sistemas multifásicos devem ser ainda tomados em conta os fenômenos interfaciais, a partição do substrato e do produto entre as duas fases e a facilidade de separação das duas fases, com vista a uma integração eficaz das etapas de bioconversão e de recuperação do produto (Airres-Barros, 2002). A Figura 2.12 mostra algumas considerações que devem ser feitas na escolha do biorreator.

Segundo Aires-Barros (2002), as características da bioconversão incluem as propriedades dos substratos e produtos (pontos de fusão e ebulição, solubilidade em água, estabilidade ao pH e temperatura); as características reacionais (pH, temperatura, controle da atividade da água) e as características

do biocatalisador. Estas incluem a localização da atividade enzimática (normalmente na fase aquosa, exceto para as lipases que são ativadas por interfaces) e os requisitos em água por parte do biocatalisador para manutenção da sua atividade catalítica. É também importante considerar as interações entre o biocatalisador e os substratos e produtos.

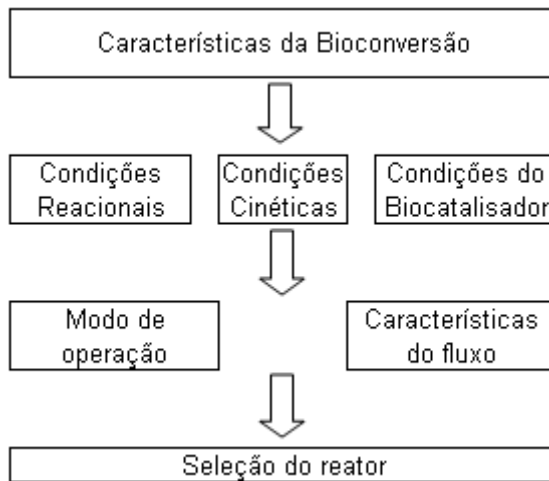


Figura 2.12 Considerações importantes para seleção do biorreator.

As condições reacionais incluem o tipo de sistema biocatalítico; a razão de fases aquosa - orgânica que condiciona a produtividade volumétrica no reator e a área interfacial disponível para a transferência de massa de substratos e produtos; a transferência de massa através da interface líquido - líquido, sólido - líquido, gás - líquido, e dentro da mesma fase; e efeitos de partição substratos e produtos. As condições cinéticas compreendem a inibição pelos substratos e/ou produtos. Com relação às condições referentes ao biocatalisador, estas incluem a concentração máxima permitida no reator; a desnaturação por agitação mecânica (no caso de reatores mecanicamente agitados); a baixa estabilidade do catalisador, devido a efeitos de temperatura, pH e presença de compostos tóxicos, além das necessidades de co-fatores, nutrientes e co-substratos e a toxicidade do solvente orgânico (Aires-Barros, 2002).

Segundo Balcão, Paiva *et al.* (1996), a maior parte dos tipos de sistemas reacionais utilizados para lipases pode ser incluída num dos seguintes casos: 1) lipase na forma sólida precipitada dentro de uma fase orgânica líquida; 2) lipase na forma solúvel em uma fase aquosa e confinada por uma membrana sólida de ultrafiltração; 3) lipase contida em uma fase aquosa e confinada por uma membrana surfactante líquida dentro de uma fase orgânica líquida; 4) lipase aprisionada em uma matriz polimérica tridimensional dispersa numa fase líquida; 5) lipase ligada a uma fase sólida dispersa numa fase líquida. Ainda segundo esses autores, estes sistemas estão em diversas configurações de biorreatores.

Estes biorreatores podem ser classificados em reatores para sistemas particulados, reatores tipo placas e reatores lineares, podendo operar em modo batelada ou contínuo, como mostrados na Figura 2.13 (Zanin e Moraes, 2004).

Os reatores para sistemas particulados compreendem os tipos: tanque agitado em batelada, tanque agitado contínuo (CSTR), leito fixo (coluna de recheio) e leito fluidizado. A grande vantagem desses reatores reside no fato que o método de imobilização da enzima independe do tamanho e da forma do reator. Apresentam grande flexibilidade, pois as partículas de biocatalisadores se acomodam à forma do reator.

No reator de tanque agitado (CSTR), as partículas de biocatalisador são dispersas na solução de substrato e a agitação é promovida por agitadores mecânicos ou agitadores orbitais. Nos reatores de leito fixo e fluidizado, o biocatalisador é mantido no interior do reator enquanto o fluido é passado pelo leito. Estes são os tipos de reatores preferidos para as aplicações em larga escala.

Biorreatores de tanque agitado têm sido os mais comumente apresentados na literatura para estudos com lipases. O reator tipo tanque agitado pode ser operado em batelada (BSTR), este é um processo típico usado em laboratório devido à simples montagem do aparato. Os reatores em batelada geralmente são os mais utilizados nos processos com enzimas em solução, entretanto enzimas imobilizadas são também empregadas. Normalmente, a enzima é introduzida no reator juntamente com o substrato, sendo que o conteúdo é descarregado quando se alcança o grau de conversão desejado. O processo batelada é útil para coletar dados sobre o processo,

como por exemplo, a produtividade do processo.

Reatores para Sistemas Particulados

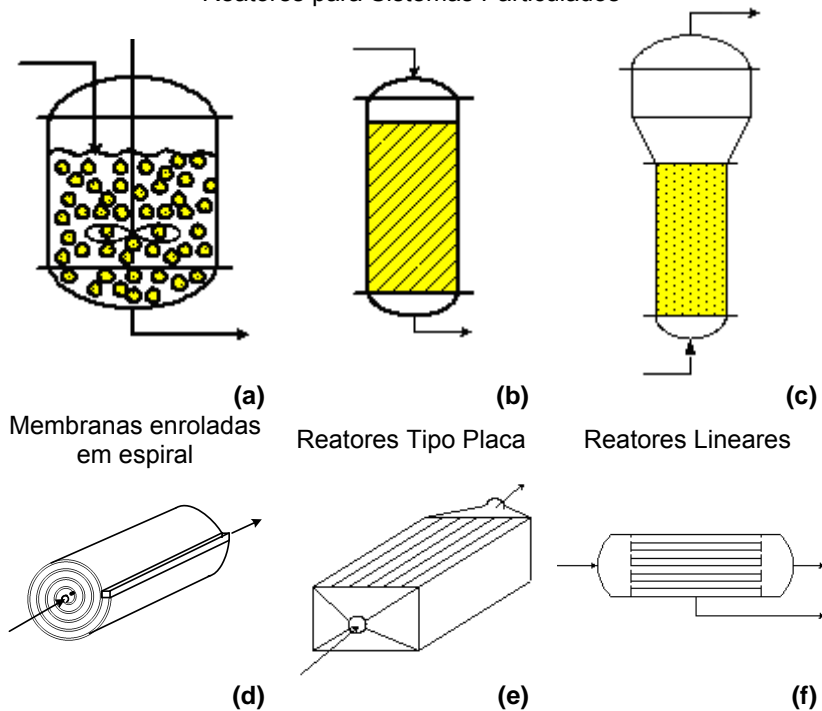


Figura 2.13 Modelos de reatores para aplicações com enzimas imobilizadas (a) CSTR, (b) leito fixo, (c) leito fluidizado, (d) membranas enroladas em espiral, (e) reator de placas paralelas e (f) reator de fibras ocas.

Fonte: Zanin e Moraes, 2004.

Fatores negativos deste tipo de processo em larga escala são: necessidade de tanque de alto volume e longo tempo de reação. É ainda importante considerar o declínio gradual na atividade enzimática em função do aumento do número de reusos. Quando a atividade enzimática diminui, o tempo de reação precisa ser aumentado adequadamente para manter um alto grau de conversão constante. Com o tempo, a capacidade da planta diminuirá e, eventualmente, ficará inaceitavelmente baixa. Neste ponto a enzima deve ser substituída. A decisão difícil é o ajuste entre capacidade e custo do catalisador.

Entretanto, é difícil imaginar uma planta operando com catalisador numa atividade enzimática 20% da inicial, o que pode ser necessário para atingir a produtividade necessária. Estes sistemas apresentam ainda outra desvantagem para uso em escala industrial, uma vez que os sistemas imobilizados não podem ser carregados em grande quantidade no reator e são susceptíveis à quebra devido às altas tensões de cisalhamento impostas pela agitação mecânica (Santos, Carvalho *et al.*, 2003; Santos, 2005; Santos, Converti *et al.*, 2005; Watanabe, Pinsirodom *et al.*, 2005) e ainda a imposição de tempos mortos de operação relativos à carga, descarga e limpeza do sistema (Zanin, 1989; Balcao, Paiva *et al.*, 1996).

Para superar ou minimizar estas dificuldades um modelo de reator tem sido utilizado, embora em escala de laboratório, é o reator com agitação provido de um cesto (*basket reactor*) que retém a enzima imobilizada, permite a reutilização do biocatalisador sem perdas consideráveis de massa e apresenta diferentes configurações (Watanabe, Kuwabara *et al.*, 2003; Sheelu, Kavitha *et al.*, 2008; Cabana, Jones *et al.*, 2009; Torres, Vazquez *et al.*, 2009). O trabalho publicado por Baltaru, Galaction *et al.* (2009) faz uma breve revisão sobre a aplicação dos reatores com cesto nas reações catalisadas por biocatalisadores. O biorreator com cesto foi descrito por Fadnavis, Satyavathi *et al.* (2007) e a invenção tem a vantagem de permitir um maior contato entre reagentes e biocatalisador, que por sua vez aumenta a velocidade de reação e a eficiência da reação biocatalítica. Outra vantagem é que o biocatalisador é separado da mistura de reação pela simples drenagem do líquido circulante e pode ser utilizado em sistemas contínuos. A Figura 2.14 apresenta algumas configurações de reatores com cesto aplicados em bioconversões e diferentes tipos de impelidores com cesta.

Deve-se destacar, também, que os reatores tipo tanque agitado podem ser operados em modo contínuo (CSTR). Neste caso, geralmente, o projeto requer tanques múltiplos operando em série para assegurar o mesmo grau de conversão para o mesmo tempo de reação. A vantagem deste sistema é a capacidade de produção da planta ser constante, pois os tanques podem conter enzimas com diferentes valores de atividades. Outra vantagem, deste projeto, é a possibilidade de inserir etapas de separação entre os tanques para eliminação de

produto ou subproduto com potencialidade de inibição na reação. Por exemplo, na produção de biodiesel essa etapa poderá ter como objetivo separar o glicerol liberado na reação (Nielsen, Brask *et al.*, 2008).

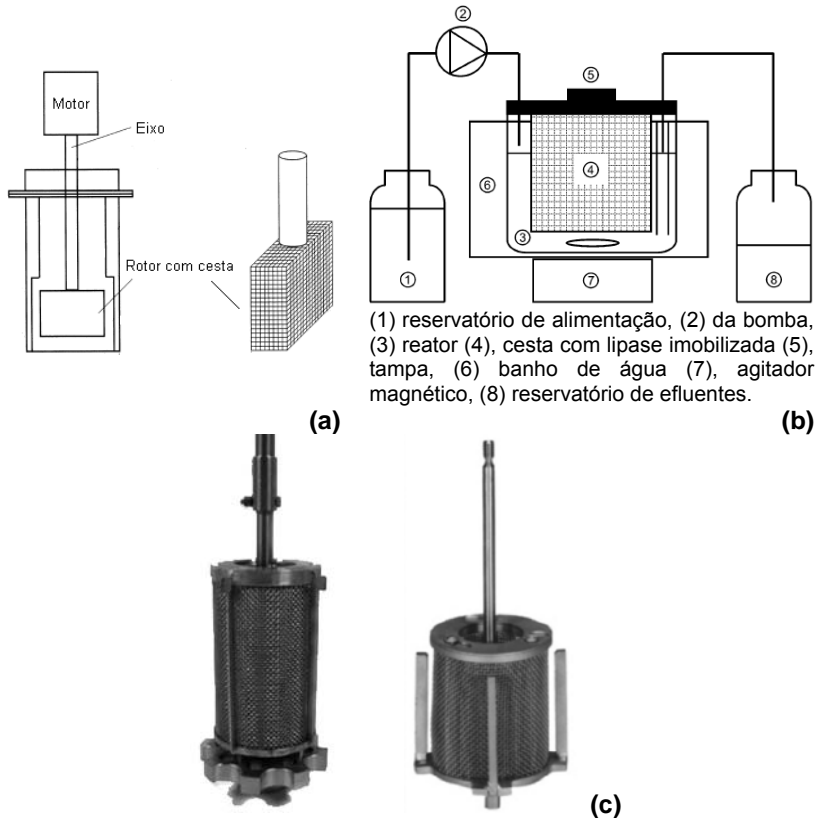


Figura 2.14 Modelos de reatores com cesto (a) reator agitado com cesto acoplado ao impelidor (b) reator agitado com cesto e (c) modelos de impelidores com cesto acoplado.

Fonte: Nagayama, Karaiwa *et al.*, 1998; Watanabe, Kuwabara *et al.*, 2003; Baltaru, Galaction *et al.*, 2009.

O tipo de agitador utilizado em biorreatores tipo tanque agitado, na produção de biodiesel via catálise enzimática, é um fator importante que deve ser avaliado. Em estudo realizado por Ognjanovic, Bezbradica *et al.* (2009) os altos rendimentos de

ésteres metílicos (99,7%) com uma pequena quantidade de enzima (3% da lipase Novozym® 435) foram obtidos devido à aplicação de diferentes condições hidrodinâmicas e modo de agitação. O reator batelada, utilizado no estudo, era equipado com uma turbina de rotor de seis pás que poderia melhorar o contato entre substrato e biocatalisador e proporcionar uma boa dispersão do biocatalisador na mistura da reação. Isso reduziu a resistência à transferência de massa e aumentou a taxa global da reação e, portanto, o desempenho do reator. A intensidade de agitação e o modo de agitação parecem ter particular importância para o processo de alcoólise utilizando reatores do tipo tanque agitado. Sharma e Singh (2008) relataram que a produção de biodiesel cresceu de 85 a 90% quando a agitação magnética foi substituída pela agitação mecânica à semelhante taxa de agitação.

O biorreator de leito empacotado é outra opção que poderia ser usada em processos em escala industrial. Embora em escala de laboratório os reatores tipo tanque agitado sejam bastante comuns, o leito fixo ou empacotado tem sido tradicionalmente usado para a maioria dos reatores catalíticos em larga escala, devido à sua alta eficiência, baixo custo e facilidade de construção e operação. Requer poucos equipamentos auxiliares além de ser muito eficiente. As tensões de cisalhamento impostas ao sistema imobilizado são menores são adequados para as reações que exigem alta quantidade de catalisador, pois ele pode acomodar 60 a 65% do catalisador (Weetall e Pitcher, 1986; Balcao, Paiva *et al.*, 1996; Kashid e Kiwi-Minsker, 2009). Algumas desvantagens para estes sistemas, entretanto, podem ser citadas, como a facilidade de obstrução do leito, aparecimento de caminhos preferenciais e fluxos de calor e massa ineficientes (Zanin, 1989; Kashid e Kiwi-Minsker, 2009).

Outra opção que permitiria melhorar as características de mistura do sistema quando comparado ao leito fixo, evitando a formação de caminhos preferenciais, seria o reator de leito fluidizado. Sob o aspecto hidrodinâmico, este biorreator seria um intermediário entre a mistura completa do CSTR ideal e o reator tubular do leito fixo ideal (Balcao, Paiva *et al.*, 1996). Conforme se aumenta a velocidade ascendente do fluido reacional, atinge-se um ponto no qual a queda de pressão no leito torna-se equivalente ao peso deste por unidade de superfície, fazendo com que as partículas percam o contato entre si e movimentem-

se de maneira semelhante a um líquido em ebulição (leito fluidizado). Acima desta velocidade, há expansão do leito até que se atinja um valor máximo (velocidade máxima de fluidização), acima do qual as partículas são carregadas para fora do reator (Baron, Willaert *et al.*, 1996).

2.6.3 Exemplos de alcoólise enzimática do óleo de palma visando à produção de biodiesel

Dentre as matérias-primas com potencial para obtenção de biodiesel, destaca-se o óleo de palma, por ser o segundo óleo mais abundante no mundo e por ser a palma caracterizada pela produtividade superior entre todas as oleaginosas (Lora e Andrade, 2009). Estudos utilizando o óleo de palma como matéria-prima para a produção enzimática de biodiesel, descritos na literatura, apresentaram bons resultados.

Abrigor, Uadia *et al.* (2000) produziram ésteres de ácidos graxos a partir do óleo de palma e óleo de coco por alcoólise com diferentes álcoois utilizando a lipase PS30 (*Pseudomonas cepacia*). Na conversão de óleo de palma para alquil-ésteres (biodiesel), o etanol apresentou maior conversão 72% seguidos pelo terc-butanol 62%, 1-butanol 42%, n-propanol 42%, iso-propanol 24% e metanol 15%. Algumas propriedades do óleo e do combustível foram avaliadas, o óleo de palma apresentou uma viscosidade cinemática de $32,40 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$, ponto névoa de 28°C e ponto de fluidez de 22°C , enquanto o biodiesel apresentou viscosidade cinemática de $9,33 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$, ponto de névoa de 12°C e ponto de fluidez de 8°C .

Al-Zuhair, Ling *et al.* (2007) estudaram o efeito da concentração de óleo de palma e metanol sobre a velocidade da alcoólise enzimática. Estes experimentos foram utilizados para propor um mecanismo adequado e testar o modelo cinético proposto. A reação ocorreu em meio orgânico (n-hexano) e foi utilizada a lipase de *Mucor miehei* em uma concentração constante de metanol de 300 mol m^{-3} . Verificou-se que, inicialmente, com a concentração do óleo de palma aumentada, a velocidade inicial da reação aumentou. No entanto, a velocidade diminuiu acentuadamente em concentrações de óleo maiores do que 1250 mol m^{-3} . Comportamento semelhante foi observado para o efeito da concentração de metanol em uma concentração constante de óleo de 1000 mol m^{-3} , a velocidade

inicial da reação caiu em concentrações de metanol superiores a 3000 mol m^{-3} . Resultados experimentais mostraram que a reação foi mais sensível à concentração de óleo, mas mais inibida pelo álcool.

Talukder, Beatrice *et al.* (2008) produziram biodiesel a partir da metanólise do óleo de palma e utilizaram a lipase imobilizada *Candida antarctica* B (Novozym® 435). Para minimizar o problema de envenenamento da lipase pelo metanol, foi desenvolvida uma solução a base de sal com sistema de liberação controlada para o metanol. O método desenvolvido minimiza o problema, dissolvendo metanol no sal, mantendo a concentração de metanol aceitável no óleo vegetal, aumentando a atividade da lipase. Os resultados da metanólise do óleo de palma, obtidos pelo método proposto, foram comparados com o processo na qual o metanol foi inserido pelo método tradicional, ou seja, três adições sucessivas. O rendimento máximo de biodiesel em ambos os sistemas foram os mesmos (97%), mas na metanólise, no método desenvolvido pelos autores, o tempo de reação necessário para atingir um rendimento máximo de biodiesel foi de 8 h, 4 vezes menor do que o método tradicional. Verificou-se que a solução de sal saturada (MgCl_2 e LiCl) estabiliza a Novozym® 435 e aumenta sua resistência térmica para a produção de biodiesel.

Moreira, Perez *et al.* (2007) estudaram a alcoólise de óleo de palma com etanol em um sistema sem solvente usando lipase, a partir de diferentes fontes (*Thermomyces lanuginosus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Penicillium camembertii*, *Candida Antarctica* e pâncreas de porco), imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico. O melhor desempenho foi alcançado com a lipase de *Pseudomonas fluorescens* que chegou a quase conversão completa (98%) em menos de 24 h de reação. O produto purificado (biodiesel) foi essencialmente inodoro e de aspecto translúcido de coloração amarelo palha. A pureza dos ésteres etílicos foi elevada e isenta de glicerina ligada. Adicionalmente, as outras propriedades, como baixo teor de umidade (0,02%), massa específica ($0,8 \text{ g cm}^{-3}$) e viscosidade cinemática (4,34 cSt), atendem às especificações exigidas pela ANP para uso como biocombustível.

Talukder, Nguyen *et al.* (2009) aplicaram três métodos diferentes de metanólise do óleo de palma refinado: 1) terc-

butanol como solvente; 2) solução de LiCl com liberação controlada e 3) sistema livre de solvente, com três adições sucessivas de metanol. As razões molares ideais (metanol:óleo) para cada método 1, 2 e 3 foram 6:1, 3:1 e 3:1, respectivamente. O rendimento de biodiesel na concentração de metanol ótima atingiu 91 a 92% após 10, 20 e 24 h, no método 1, 2 e 3, respectivamente. A produção de biodiesel permaneceu constante ao longo de cinco ciclos repetidos no método 1, enquanto que caiu para 68 e 71% no quinto ciclo no método 2 e 3, respectivamente. Os resultados mostram que a utilização do terc-butanol foi a melhor estratégia para a produção de biodiesel.

Raita, Champreda *et al.* (2010) aplicaram um novo biocatalisador, micro cristais revestidos de proteína (PCMCs), obtidos a partir de uma preparação enzimática comercial de uma cepa de *Aspergillus* recombinante, na síntese de biodiesel a partir de óleo de palma e etanol. Uma produção de ésteres alquílicos de óleo de palma de 89,9% em base molar foi obtida utilizando 20% em relação ao triglicerídeo da lipase PCMC, razão molar (etanol:ácidos graxos:) de 4:1, temperatura de 45 °C por 24 h na presença de terc-butanol na proporção molar 1:1 em relação ao triglicerídeo. A estabilidade operacional da lipase PCMC melhorou com o tratamento com terc-butanol permitindo a reciclagem do biocatalisador por 8 ciclos consecutivos, com ligeira redução da atividade.

2.6.4 Processos contínuos de alcoólise enzimática de óleos e gorduras visando à produção de biodiesel

Apesar da ampla gama de possibilidades e do grande interesse pela catálise enzimática, processos industriais que envolvem lipases são relativamente escassos e limitados (Severac, Galy *et al.*, 2011). A questão principal, em relação aos processos enzimáticos, é o custo relativamente elevado do biocatalisador. A primeira forma de reduzir o impacto econômico dos custos da enzima é a capacidade de recuperar e reutilizá-la, graças ao processo de imobilização (Bosley e Peilow, 1997; Tischer e Wedekind, 1999; Du, Xu *et al.*, 2004). Outra maneira de diminuir o custo operacional da enzima é aumentar a estabilidade operacional do biocatalisador, que é crucial para sua aplicabilidade industrial, pois influenciará diretamente o custo da enzima por quilograma de produto (Hills, 2003; Slotema,

Sandoval *et al.*, 2003). A Tabela 2.9 destaca os trabalhos da literatura sobre processos contínuos de alcoólise enzimática.

Tabela 2.9 Processos contínuos de alcoólise enzimática para a produção de biodiesel em reator tipo leito fixo.

Lipase	Óleo	Álcool	Meio	Referência
Novozym® 435	Óleo residual	Metanol	Isento de solventes	Shimada, Watanabe <i>et al.</i> (2002)
<i>Burkholderias cepacia</i> (IM-BS30)	Óleo residual	Etanol	Isento de solventes	Hsu, Jones <i>et al.</i> (2004)
<i>Candida</i> sp. 99-125 imobilizada em membrana	Óleo vegetal Óleo residual	Metanol	Éter de petróleo Água	Nie, Xie <i>et al.</i> (2006)
Novozym® 435	Óleo de semente de algodão	Metanol	Terc-butanol	Royon, Daz <i>et al.</i> (2007)
Novozym® 435	Óleo de soja	Metanol	n-hexano Terc-butanol	Shaw, Chang <i>et al.</i> (2008)
Novozym® 435	Óleo de palma residual	Metanol	Terc-butanol	Halim, Kamaruddin <i>et al.</i> (2009)
Novozym® 435	Óleo de soja	Isopropanol	Isento de solventes	Chang, Chen <i>et al.</i> (2009)
Novozym® 435 LipoZyme TL-IM	Óleo de girassol	Metanol Etanol Isopropanol	Ésteres alquílicos de ácidos graxos	Jachmanian, Dobroyan <i>et al.</i> (2010)
Lipase AK e Lipase AY	Óleo de palma	Etanol	Isento de solventes	Tongboriboon, Cheirsilp <i>et al.</i> (2010)
Novozym® 435	Óleo de soja	Metanol	Terc-butanol	Chen, Ju <i>et al.</i> (2011)

Segundo Shimada, Watanabe *et al.* (2002), o biodiesel pode ser produzido por metanólise de resíduos de óleo

comestível catalisado por lipase. Os autores observaram que o problema do baixo grau de metanólise ocorre devido à inativação irreversível da lipase pelo contato com metanol insolúvel. Com base neste resultado, desenvolveram um sistema de metanólise em etapas com lipase imobilizada de *Candida antarctica* (Novozym® 435). A metanólise realizada em dois passos foi mais eficaz para a produção de biodiesel: a primeira etapa da reação foi conduzida na presença de 1/3 de equivalente molar de metanol e a segunda etapa foi realizada adicionando 2/3 de equivalente molar de metanol. A conversão do substrato a biodiesel foi superior a 90% e a lipase pôde ser utilizada por mais de 100 dias, sem diminuição da atividade (Figura 2.15). Outros estudos realizados por Watanabe, Shimada *et al.* (2000; 2001) também relatam o efeito da inativação das lipases pelo metanol.

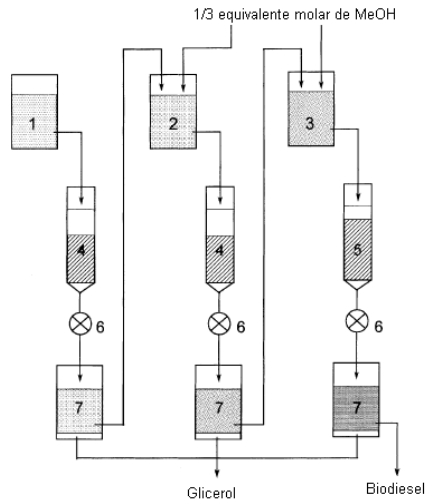


Figura 2.15 Produção de biodiesel contínua com três biorreatores de leito fixo em série. 1, 2 e 3- armazenamento substrato; 4- biorreator leito fixo empacotado com 3 g de lipase imobilizada de *Candida antarctica*; 5- biorreator leito fixo empacotado com 4,5 g de lipase imobilizada de *Candida antarctica*; 6- bomba peristáltica; 7- receptor da mistura de reação eluída.

Fonte: Shimada, Watanabe *et al.*, 2002.

Hsu, Jones *et al.* (2004) estudaram a alcoólise contínua de óleo residual de fritura com etanol, utilizando a lipase

imobilizada de *Burkholderias cepacia* (IM-BS-30) em um reator de leito fixo com recirculação. As condições operacionais que maximizaram a produção de ésteres foram: vazão de 30 mL min^{-1} , temperatura de 50°C , razão molar de substratos 4:1 etanol:óleo e tempo de reação de 48 h. Nestas condições o rendimento de ésteres foi superior a 96%.

Nie, Xie *et al.* (2006) estudaram a metanólise contínua utilizando um reator de três colunas empacotadas com a lipase *Candida* sp. 99-125 imobilizada em membrana de algodão. O reator operou a temperatura de 40°C . Em cada passo da reação foi utilizada uma razão molar metanol:óleo de 1:1. Éter de petróleo foi usado como o solvente (1:1, petróleo éter/óleo, v/v) e 10% de água (água/óleo, v/v) foram adicionados no sistema de reação. Segundo os autores, a velocidade de fluxo de substrato é um parâmetro importante nos experimentos, pois se a velocidade for muito elevada, o tempo de contato entre substrato e a lipase será demasiado curto e a reação será incompleta. Se a velocidade for muito baixa, o volume de produção do reator será reduzido. Foram testadas vazões de até 40 L h^{-1} e a conversão de éster metílicos diminuiu com o aumento da vazão. A estabilidade operacional da lipase imobilizada foi superior a 500 h e a conversão dos ésteres metílicos variou de 25% a 35% (Figura 2.16).

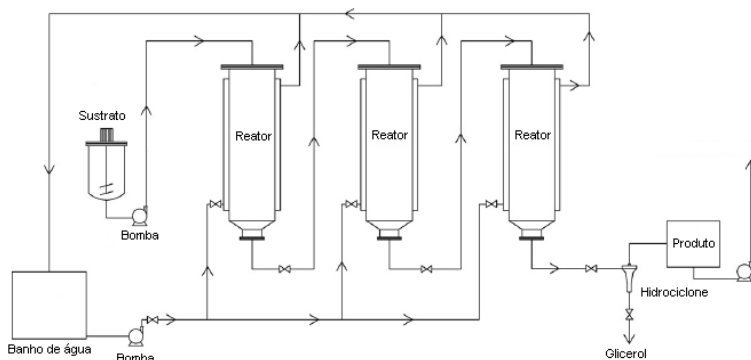


Figura 2.16 Processo de produção de biodiesel em reator de leito fixo.
Fonte: Nie, Xie *et al.*, 2006.

Royon, Daz *et al.* (2007) testaram a estabilidade

operacional da lipase Novozym® 435 no processo contínuo. O meio de reação era constituído de metanol e óleo de semente de algodão numa razão molar metanol:óleo de 6:1, uma concentração de solvente de 32,5% e uma taxa de fluxo de $9,6 \text{ mL h}^{-1} \text{ g}_{\text{enzima}}^{-1}$. No processo batelada, foi possível observar que a inibição da enzima, causada pelo metanol insolúvel, foi eliminada pela adição do terc-butanol ao meio reacional, que também proporcionou um aumento no rendimento dos ésteres. Um rendimento de 97% foi observado após 24 h de reação a 50°C . Rendimento de 95% foi obtido utilizando um reator contínuo de leito fixo com uma vazão de $9,6 \text{ mL h}^{-1} \text{ g}_{\text{enzima}}^{-1}$. O sistema contínuo operou por mais de 500 h sem apresentar expressiva diminuição no rendimento dos ésteres.

Shaw, Chang *et al.* (2008) utilizaram óleo de soja; diferentes relações molares de metanol e cosolvente (n-hexano: terc-butanol 9:1 v/v) foram misturadas em um tanque de alimentação. A alcoólise foi realizada em um reator de leito empacotado constituído por um tubo de aço inoxidável com 25 cm de comprimento e diâmetro interno de 0,25 cm. A mistura foi bombeada através do reator contínuo (empacotada com 1,0 g Novozym® 435) de acordo com as condições estabelecidas pelo planejamento experimental. O produto foi recolhido na saída do tubo de reação após 30 min para análise dos ésteres. O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a avaliação de uma abordagem estatística para compreender melhor a relação entre as variáveis de uma reação enzimática de produção de biodiesel contínua e a resposta (conversão molar de ésteres metílicos). Entre os diversos tratamentos, a conversão molar mais elevada (74,08%) foi obtida com as condições de: 55°C , vazão $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ e razão molar (metanol:óleo de soja) de 5:1, e a menor conversão (17,37%) sob as condições de: 45°C , vazão $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e razão molar (metanol:óleo de soja) 4:1. Os resultados revelaram que a temperatura da reação e a vazão de alimentação do reator foram os parâmetros mais importantes e exerceram um efeito global estatisticamente significativa ($p < 0,01$) sobre a conversão da reação.

Halim, Kamaruddin *et al.* (2009) realizaram a alcoólise de óleo de palma residual em um sistema equipado com controlador de temperatura tipo PID (Figura 2.17). O reator de leito empacotado era constituído por duas colunas de vidro com dimensões de 1 cm (diâmetro interno) e 18 cm de comprimento.

A mistura de substrato foi alimentada utilizando uma bomba peristáltica. A coluna foi empacotada com enzima imobilizada, foi utilizada uma razão molar álcool:óleo: de 4:1 e terc-butanol como solvente (1:1 terc-butanol:óleo v/v). A vazão de alimentação e a altura do leito (quantidade de enzima imobilizada) foram variadas para estudar o efeito causado na alcoólise do óleo de palma residual. A reação foi realizada a 40 °C e as amostras foram coletadas após 3 h de reação.

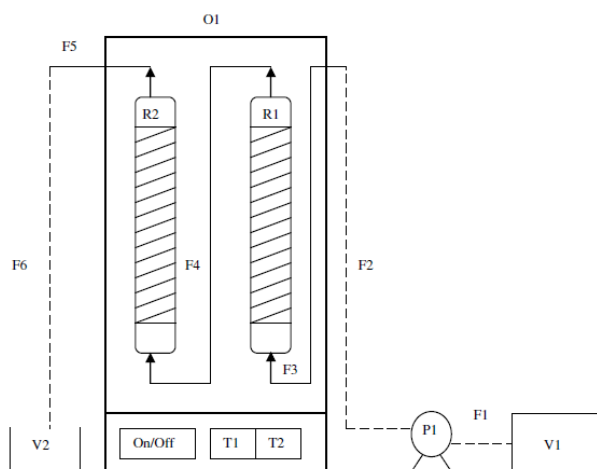


Figura 2.17 Esquema do reator contínuo de leito fixo. V1- tanque de alimentação; V2- tanque de coleta de produto; F1 e F2- fluxo de alimentação (--- tubo C-FLAX); F3- fluxo de alimentação (— tubo de aço inoxidável); F4, F5 e F6- produto da reação; T1 e T2- temperatura de entrada e saída do reator; P1- Bomba peristáltica e O1- Ambiente com temperatura controlada.

Fonte: Halim, Kamaruddin *et al.*, 2009.

Os autores alcançaram um rendimento máximo de ésteres metílicos de 80% com 12 cm de altura do leito e uma vazão de $0,55 \text{ mL min}^{-1}$. O aumento da vazão ($> 0,6 \text{ mL min}^{-1}$) provocou diminuição significativa no rendimento de ésteres. Este comportamento também foi observado por outros pesquisadores, a citar: Laudani, Habulin *et al.* (2007) e Çiftçi, Fadiloglu *et al.* (2009). A baixas vazões, o baixo rendimento dos ésteres metílicos foi obtido devido a resistência à transferência de massa pela camada líquida do filme. No entanto, com o aumento da

vazão ($0,9$ a $1,02 \text{ mL min}^{-1}$), o substrato só passaria pela enzima sem interagir com a enzima, consequentemente ligava-se fracamente ao sítio ativo da enzima. Assim, há menos contato entre o substrato e os sítios ativos da enzima e menores rendimentos.

Foi observado também que o aumento da altura do leito além de 9 cm não tem muito efeito sobre do rendimento dos ésteres metílicos. Isto pode ser devido ao efeito de saturação da quantidade de enzima. Pode ser explicado considerando que as moléculas de sítio ativo da enzima presentes em excesso não serão expostas ao substrato e permanecerão no interior da massa de partículas de enzimas sem contribuir significativamente para a reação (Gandhi, Sawant *et al.*, 1995). Halim, Kamaruddin *et al.* (2009) otimizaram o processo e encontraram a condição ótima de $10,53 \text{ cm}$ altura de leito ($3,3 \text{ g}$ Novozym® 435) e vazão de substrato de $0,57 \text{ mL min}^{-1}$, alcançando um rendimento de $80,30\%$ de ésteres metílicos.

A estabilidade operacional da lipase imobilizada é um parâmetro importante em um processo industrial, uma vez que ela afeta diretamente o custo do processo (Nie, Xie *et al.*, 2006). No trabalho realizado por Halim, Kamaruddin *et al.* (2009) o equilíbrio da reação de alcoólise foi alcançado a 4 h e o rendimento foi de 80% . A estabilidade operacional da lipase imobilizada foi superior a 120 h , e manteve um valor de 79 a 80% durante todo o experimento.

Chang, Chen *et al.* (2009) estudaram o processo contínuo de produção de biodiesel em um reator de leito fixo, utilizando a lipase Novozym® 435, a partir de óleo de soja com isopropanol em sistema livre de solvente. As condições que permitiram uma conversão de 75% de éster isopropílico no processo contínuo foram: vazão de $0,10 \text{ mL min}^{-1}$, $51,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e razão molar de $4,14:1$ (álcool:óleo:), utilizando $1,7 \text{ g}$ de lipase. A lipase apresentou excelente estabilidade operacional e o sistema foi operado durante sete dias sem diminuir a produção de éster isopropílico. Segundo os autores, o álcool isopropílico é um subproduto da indústria eletrônica e sua utilização reduziria os custos do processo de produção de biodiesel.

Jachmanian, Dobroyan *et al.* (2010) estudaram a adição de ésteres ao substrato da reação de alcoólise contínua do óleo de girassol com etanol e isopropanol. A adição de ésteres alquílicos de ácidos graxos no início da reação pode ser útil ao

modificar a intersolubilidade entre o óleo e o álcool. Uma forte influência sobre as características da composição da mistura pode ser convenientemente orientada para a melhoria do desempenho de enzima. Novozym® 435 e Lipozyme TL-IM foram testadas quanto sua atividade catalítica e produtividade na transformação contínua, usando alimentações de substrato de composição variada. Foram alcançadas concentrações mássicas de ésteres na ordem de 80% por 80 h de ensaio, utilizando uma proporção de 35:35:30 (etanol:óleo de girassol:ésteres etílicos) e a lipase Novozym® 435. Os autores sugerem que a solubilidade do glicerol no produto pode ser um fator crítico no ajuste da composição do substrato para que ele não leve à deposição de glicerol na superfície da enzima e conseqüente redução na atividade do catalisador.

Tongboriboon, Cheirsilp et al. (2010) realizaram a síntese contínua de biodiesel utilizando um reator de leito fixo com uma mistura de lipases imobilizadas em Accurel EP-100 (Lipase AK de *Pseudomonas fluorescens* e Lipase AY de *Candida rugosa*) para a alcoólise do óleo de palma com etanol em meio livre de solvente. O reator consistia em duas colunas empacotadas, na primeira as duas enzimas estavam bem misturadas, e na segunda coluna a Lipase AY estava no fundo e a Lipase AK no topo. O substrato foi alimentado a um fluxo ascendente de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ e a temperatura foi controlada por circulação de água a 45°C . A conversão média do óleo de palma em biodiesel na coluna empacotada com as lipases separadas foi de apenas 14%. Isto pode ser devido ao efeito inibitório do etanol sobre a atividade da Lipase AY. Na coluna com as lipases misturadas a produção média de biodiesel foi de 22%. Para aumentar ainda mais a conversão do óleo de palma em biodiesel, os autores aumentaram o comprimento da coluna de reação. O teor de biodiesel na coluna com as lipases separadas atingiu valor máximo de 67% em 8 h, mas diminuiu para 59% e 49% após 12 e 22 h, respectivamente.

Neste mesmo estudo foi testada a adição gradual de etanol. Observou-se que a diferença da conversão de biodiesel quando todo o etanol foi adicionado em uma única etapa (89%) e de quando ele foi adicionado em três etapas (91%) foi de apenas 2%. Assim, a adição em uma única etapa é a melhor escolha, pois a adição gradual do substrato complica o design do processo, principalmente quando este for contínuo

(Tongboriboon, Cheirsilp *et al.*, 2010).

Chen, Ju *et al.* (2011) desenvolveram um processo contínuo em um reator de leito fixo, utilizando a lipase Novozym® 435, para produzir biodiesel a partir de óleo de soja com metanol. Foi utilizado terc-butanol (32,5% em relação à massa de óleo) como solvente, pois é o meio ideal que aumenta a miscibilidade do metanol com óleos vegetais, bem como atua como agente de regeneração da lipase (Chen e Wu, 2003; Li, Du *et al.*, 2006; Royon, Daz *et al.*, 2007; Talukder, Wu *et al.*, 2009). A partir de um planejamento estatístico de experimentos e análise de superfície de resposta foram investigadas as afinidades entre as variáveis da reação (temperatura de reação, vazão e razão molar do substrato) e resposta (conversão molar). As condições ótimas para operação contínua do reator de leito fixo proporcionaram uma conversão molar máxima de 83,31% com uma vazão de 0,1 mL min⁻¹, 52,1 °C e a uma razão molar de 4:1 (álcool:óleo). O reator de leito operou por mais de 30 dias sem uma perda significativa na conversão de substrato.

2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, a importância e o interesse da tecnologia enzimática para a produção de biodiesel são ilustrados pelo grande número de publicações observadas nos últimos anos e também a perspectiva de estabelecimento de alguns processos em escala industrial. Pesquisadores de todo o mundo têm tentado superar as limitações da produção de biodiesel via catálise enzimática, tais como o alto custo da enzima, baixo rendimento, tempo de reação elevada e a necessidade de solventes orgânicos. No entanto, percebe-se pela revisão bibliográfica realizada, que são poucos os trabalhos relacionados a processos contínuos de produção de biodiesel utilizando a catálise enzimática. O processo contínuo e a utilização de lipases imobilizadas e confinadas no reator podem proporcionar uma redução nos custos do processo de produção industrial de biodiesel.

Para o desenvolvimento do presente projeto optou-se pela utilização do óleo de palma, pois o biodiesel originário de palmáceas apresenta uma qualidade superior aos das demais oleaginosas, devido ao maior teor de ácidos graxos de baixa massa molecular. Além de o óleo de palma ter um dos maiores

rendimentos de óleo por hectare e o Brasil ter uma grande potencialidade, devido às suas características geográficas e climáticas, para a produção desta cultura.

Entre as lipases disponíveis comercialmente, foi selecionada para o desenvolvimento do presente trabalho, a lipase de *Candida antarctica* (Novozym® 435) por ser utilizada como referência na literatura e, também, a lipase de *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK) imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (AK SiO₂-PVA), por possuir resultados na literatura que a indicam como promissora para o tipo de óleo estudado.

Outra consideração importante para melhorar a viabilidade econômica de produção de biodiesel é a utilização do subproduto primário, o glicerol. O glicerol pode ser utilizado como substrato para a produção de diversos produtos, entre as quais podemos citar a produção de biomoléculas de alto valor agregado como polímeros biodegradáveis, obtidos por processos biológicos, e emulsificantes. O glicerol produzido pela catálise enzimática não precisa passar por processos de purificação como ocorre com o glicerol produzido a partir da catálise química do biodiesel e serve melhor às aplicações biotecnológicas. Em geral, tanto a catálise química como a biológica pode ser utilizada para converter o glicerol em produtos de valor agregado. No entanto, pesquisas adicionais e desenvolvimento são necessários para tornar estes processos lucrativos o suficiente para serem incorporado na produção de biodiesel.

Por fim, o etanol foi utilizado no processo de alcoólise por ser de interesse nacional e, no Brasil, economicamente viável. Espera-se com o trabalho contribuir para a redução dos custos de produção de biodiesel via catálise enzimática, aumentando a competitividade deste processo, e, assim, colaborar com a redução da poluição ambiental e redução de subprodutos químicos indesejáveis.

3. Material e métodos

3.1 MATERIAL

3.1.1 Enzimas

Entre as lipases disponíveis comercialmente foi selecionada, para o desenvolvimento do presente trabalho, duas preparações comerciais de lipases microbianas: *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK – Lote 20715TD), adquirida na forma solúvel da *Amano Enzyme Inc.* (Japão) e, posteriormente imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (SiO₂-PVA), e lipase de *Candida antarctica* doada pela *Novozymes Latin America Ltda.* (Araucária, Paraná), na forma imobilizada em suporte acrílico (Novozym® 435).

A Tabela 3.1 apresenta as propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (SiO₂-PVA) e ativada com epiclorigrina.

Tabela 3.1 Propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (SiO₂-PVA) catalisando a hidrólise do azeite de oliva.

Parâmetros	
pH ótimo	8,9
Temperatura ótima (°C)	58
Parâmetros cinéticos	
Constante de Michaelis-Menten K _m (mM)	293
Velocidade específica máxima de reação V _{max} (U mg ⁻¹)	1169

Fonte: Santos, Paula *et al.*, 2008.

Novozym® 435 é uma preparação de lipase de *Candida antarctica* (lipase B) produzida por fermentação submersa de uma linhagem de *Aspergillus* geneticamente modificada e imobilizada por adsorção em resina aniônica macroporosa (Lewatit® VP OC 1600, Bayer). Este suporte apresenta área superficial (BET) de 130 m² g⁻¹, diâmetro médio do poro de 150 Å e volume do poro de 0,5 cm³ g⁻¹ (Dalla Rosa, 2009). Essa preparação de lipase é classificada como não específica e termo-estável, podendo ser usada em temperaturas entre 30 a 70 °C.

No entanto, para estender a estabilidade operacional, é recomendado trabalhar em temperaturas na faixa de 50 a 60 °C (Novozymes, 2007).

3.1.2 Óleo vegetal

Todos os experimentos foram realizados com óleo de palma refinado, fornecido pela *Agropalma* (Pará, Brasil). De acordo com os laudos técnicos fornecidos pela empresa, a amostra empregada no desenvolvimento deste projeto apresenta as características mostradas na Tabela 3.2 e a Tabela 3.3 mostra a composição em ácidos graxos do óleo de palma refinado.

Tabela 3.2 Características do óleo de palma refinado fornecido pela Agropalma.

Atributos	Agropalma	Limites (AOCS*)
Acidez (% ácido palmítico)	0,034	≤ 0,05
Cor (Lovibond Red 51/4)	1,6	≤ 4,0
Índice de iodo (Wijjs)	52,82	51 – 55
Índice de peróxidos (mEq Kg ⁻¹)	0	≤ 1,0
Ponto de fusão (°C)	34,6	36 ± 2

*AOCS - American Oil Chemists' Society

Fonte: Agropalma, 2007.

Tabela 3.3 Composição em ácidos graxos do óleo de palma refinado.

Composição em Ácidos Graxos	(%)
Ácido Láurico (C 12:0)	0,2 ± 0,1
Ácido Mirístico (C 14:0)	0,7 ± 0,5
Ácido Palmítico (C 16:0)	54,2 ± 5
Ácido Palmitoleico (C 16:1)	0,2 ± 0,2
Ácido Esteárico (C 18:0)	6 ± 2
Ácido Oleico (C 18:1)	32,3 ± 3
Ácido Linoleico (C 18:2)	6 ± 2
Ácido Linolenico (C 18:3)	Traços
Ácido Araquídico (C 20:0)	0,4 ± 0,2
Ácidos Trans	Traços

Fonte: Agropalma, 2007.

3.1.3 Reagentes

Outros reagentes utilizados neste trabalho:

- Solventes: etanol 99% (Nuclear), hexano (Nuclear), acetona (Synth) e terc-butanol (Cromoline).
- Ácido clorídrico (mínimo 36%, Isofar), álcool polivinílico (MM 72.000, Reagen), epícloridrina (Sigma), goma arábica em pó pura (Synth), hidróxido de potássio (Merck), indicador ácido - base (fenolftaleína - Coleman), azeite de oliva comercial com baixo teor de acidez, 0,5 g 100 g⁻¹ (Carbonell), polietilenoglicol (MM 1500, Synth) e tetraetilortossilicato (Sigma – Aldrich).
- Padrões cromatográficos: laurato de etila, meristato de etila 99%, oleato de etila 98% (Aldrich), palmitato de etila > 99%, estearato de etila 99% e linoleato de etila > 99% (Sigma).

3.1.4 Equipamentos

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 Equipamentos utilizados nos ensaios.

Equipamento	Modelo / Fabricante
Aagitador magnético	Modelo DI-03, Dist
Aaquecedor portátil	Modelo A-03, Mondial Modelo AQC408, Cadence
Balança analítica	Modelo U210A, BEL Engineering
Banho termostático com controle microprocessado	Modelo DI-911, Dist Modelo MQBMP-01, Microquímica Equipamentos
Bomba peristáltica	Modelo Perimax 12, Sepetec Modelo SJ-1211, ATTO
Cromatógrafo a gás	Modelo GC-3800, Varian Modelo GC-2010AF, Shimadzu
Determinador de umidade	Modelo ID 50, Marte
Resistência flexível	Resistência flexível 25W, KW Resistências Elétricas
Viscosímetro	Modelo LVDVIIICP-CP 520, Brookfield

3.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.2.1 Imobilização da lipase em SiO₂-PVA

3.2.1.1 Síntese do suporte

O suporte, um composto híbrido de polissiloxano - álcool polivinílico foi inicialmente sintetizado conforme metodologia descrita por Barros, Almeida *et al.* (2002), pela mistura de 5 mL de tetraetilortosilicato (TEOS), 5 mL de etanol e 6 mL de uma solução de álcool polivinílico (PVA) 2% (m/v). Essa mistura foi aquecida a 60 °C, sob agitação, com adição de 0,2 mL de ácido clorídrico concentrado por 40 min. A mistura foi vertida em moldes de silicone e mantida à temperatura ambiente por 48 h (aproximadamente) para completa solidificação (formação da rede interpenetrada de polissiloxano - álcool polivinílico (SiO₂-PVA)). O composto foi triturado até a obtenção de partículas que passassem completamente por uma peneira padrão série *Tyler* de 42 mesh e ficassem retidas em peneira de 60 mesh (aproximadamente 0,231 a 0,308 mm de diâmetro de partículas). Esta matriz foi caracterizada por Santos, Paula *et al.* (2008) em relação ao diâmetro médio de poros de 22,91 Å, área superficial (BET) de 461 m² g⁻¹ e volume de poros de 0,275 cm³ g⁻¹.

3.2.1.2 Ativação do suporte

O suporte foi embebido em solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5) contendo 2,5% (v/v) do agente de ativação (epicloridrina) na proporção sólido:líquido de 1:10, sendo mantido sob agitação magnética branda (50 rpm) por 1 h. Após este período, o suporte foi lavado com água destilada e solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 8,0) e, em seguida, seco em estufa a 60 °C por 24 h.

3.2.1.3 Imobilização da lipase

O suporte ativado foi embebido em hexano numa relação sólido:líquido de 1:10 e mantido sob agitação branda por 2 h. Após este período, para cada grama de suporte ativado (matéria

seca), foram adicionados 350 mg da preparação de lipase na forma livre e 100 μL de solução aquosa contendo 5 mg mL^{-1} de polietilenoglicol (PEG-1500). O sistema foi mantido sob agitação até a completa evaporação do hexano. A atividade hidrolítica da lipase imobilizada foi determinada conforme descrito por Soares, De Castro *et al.* (1999).

3.2.2 Determinação da massa específica do sólido

A massa específica do sólido foi determinada em balão volumétrico previamente aferido com água à temperatura ambiente. Pesou-se uma massa conhecida de partículas no balão volumétrico (10 mL) adicionou-se água destilada e aplicou-se vácuo, a fim de eliminar o ar contido nos espaços intra e interpartículas. O balão volumétrico foi completado com água e o volume ocupado pelo sólido foi obtido por diferença. A massa específica do sólido foi calculada como a relação entre a massa e o volume ocupado pelos sólidos (Zanin, 1989).

3.2.3 Processo contínuo de produção de biodiesel

Os ensaios de produção contínua de biodiesel foram realizados em dois tipos de reatores: reator tipo tanque agitado com cesta (Experimentos 1, 2, 3 e 4) e reator tipo leito fixo (Experimentos 5 a 11). Os Experimentos 1 a 4, 10 e 11 foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica da UFSC e os Experimentos 5 a 9 foram realizados no Laboratório de Biocatálise da USP-EEL.

3.2.3.1 Calibração da bomba peristáltica

A bomba peristáltica foi calibrada sob as mesmas condições utilizadas nos ensaios de produção do biodiesel, com relação à razão molar álcool:óleo do meio reacional e a temperatura (Tabelas 3.5 e 3.6). A mangueira utilizada foi de marprene 1,6 mm X 0,5 mm (WATSON – 913.AJ05.016). O ajuste inicial da bomba foi feito levando em consideração a calibração do fabricante que utiliza água para fazer a curva de calibração. A partir desse dado, foi feito o ajuste manual na bomba para alcançar os valores das vazões utilizadas nos

ensaios. O processo consistiu na coleta de determinado volume cronometrando-se o tempo.

3.2.3.2 Cálculo do tempo espacial

O tempo espacial, para os reatores tipo tanque agitado com cesta e leito fixo, foi definido pela Equação 3.1 (Fogler, 1999).

$$\tau = \frac{V}{v} \quad (3.1)$$

$$V = V_{\text{reator}} - V_{\text{catalisador}} \quad (3.2)$$

$$V_{\text{catalisador}} = \frac{m}{\rho_s} \quad (3.3)$$

Sendo:

τ = tempo espacial (h),

V = volume útil (mL),

v = vazão volumétrica na entrada do reator (mL h⁻¹),

V_{reator} = volume do reator (mL),

$V_{\text{catalisador}}$ = volume ocupado pelo catalisador (mL),

m = massa de catalisador (g),

ρ_s = massa específica do sólido (g mL⁻¹).

3.2.3.3 Produção do biodiesel em reator tipo tanque agitado com cesta

A produção de biodiesel, em modo contínuo, foi realizada em reator de vidro encamisado com volume útil de 60 mL, utilizando-se agitação magnética vigorosa e controle de temperatura por meio de um banho termostático. A enzima foi separada do meio reacional por uma cesta, confeccionada em aço inox 304, malha 100. Esta cesta foi utilizada para garantir a integridade das partículas da enzima, em função da utilização de agitação magnética vigorosa.

A mistura reacional de óleo de palma, etanol e solvente (quando presente) foi mantida no tanque de alimentação, sob agitação magnética e temperatura controlada e foi bombeada, com auxílio de uma bomba peristáltica na vazão ajustada, até o reator com cesta. Foi acoplado um condensador no tanque de alimentação e no reator com cesta. A Figura 3.1 apresenta um esquema do aparato experimental utilizado nos ensaios e a Figura 3.2 apresenta o modelo de cesta utilizada no reator e suas dimensões.

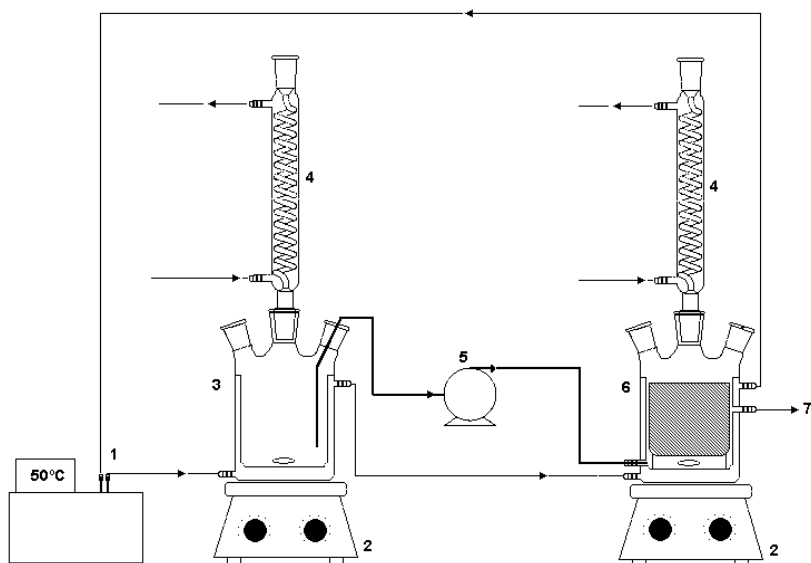
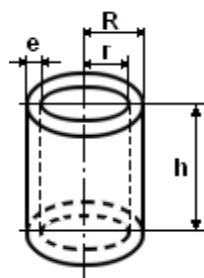
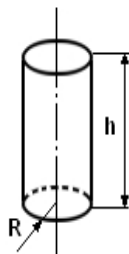


Figura 3.1 Aparato experimental utilizado nos experimentos em modo contínuo de produção de biodiesel com o reator tipo tanque agitado com cesta. 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Tanque de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Reator tipo tanque agitado com cesta, 7- Saída de produto.



(a)



(b)



(c)

Figura 3.2 (a) Dimensões da cesta de aço inox: $e = 0,02$ cm; $R = 2,3$ cm; $r = 2,28$ cm; h (total) = $5,0$ cm e h (útil) = $1,98$ cm. (b) Dimensões dos pés da cesta: $R = 0,12$ cm e $h = 1,95$ cm. (c) Foto da cesta utilizada no reator tipo tanque agitado.

A Tabela 3.5 apresenta as condições empregadas nos ensaios com o reator tipo tanque agitado com cesta.

Tabela 3.5 Condições utilizadas nos experimentos realizados no reator tipo tanque agitado com cesta, utilizando a lipase Novozym® 435.

Experimento	Razão molar (etanol:óleo)	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo espacial (h)	Vazão (mL min ⁻¹)
1	6:1	Ausência	45	6,0	0,126
2	6:1	Ausência	45	6,0	0,126
3	9:1	Ausência	50	13,4	0,069
4	9:1	Presença	50	13,1	0,070

Estes ensaios foram realizados somente com a lipase Novozym® 435 e a quantidade de enzima utilizada nos experimentos foi de 5% (m/m) em relação à massa total de substrato. Os Experimentos 1, 2 e 3 foram realizados na ausência de solvente e o Experimento 4 na presença do solvente terc-butanol na proporção de 30% (v/v) em relação ao óleo de palma. As condições reacionais utilizadas nos Experimentos 1 e 2 foram baseadas em ensaios preliminares realizados em modo batelada.

Os Experimentos 1 e 2 foram iniciados em processo

batelada durante as primeiras 6 h. Após este período, iniciou-se a alimentação contínua do biorreator. O progresso da reação foi acompanhado pela retirada de amostras, no primeiro tempo espacial, a cada 2 h e, após o início da alimentação, a cada 6 h. Nos Experimentos 3 e 4, a alimentação do biorreator foi iniciada no tempo 0 h e foram coletadas duas amostras diárias (intervalos de 16 e 8 h). As amostras foram estocadas a -2 °C até a realização das análises cromatográficas para quantificação dos ésteres de etila.

3.2.3.4 Cálculo da velocidade específica de formação de ésteres etílicos produzidos no reator tipo tanque agitado com cesta

A partir de um balanço de massa para os ésteres etílicos (Equação 3.4), considerando o reator tipo tanque agitado ideal, pode-se calcular a velocidade específica de formação destes ésteres, conforme apresentado na Equação 3.6. No balanço de massa para os ésteres etílicos, foi considerado que a vazão mássica do meio reativo à entrada do reator é a mesma que da saída e que a variação da massa específica da mistura reacional pode ser desprezada (Equação 3.5). As considerações são particularmente verdadeiras para o estado estacionário. Para o reator operado em batelada, a velocidade específica de produção de ésteres é a própria derivada da concentração de ésteres em relação ao tempo.

$$\frac{d(C_e \cdot \rho \cdot V)}{dt} = F \cdot C_e^E - F \cdot C_e^S + r_e \cdot \rho \cdot V \quad (3.4)$$

$$\frac{dC_e}{dt} = \frac{(C_e^E - C_e^S)}{\theta} + r_e \quad (3.5)$$

$$r_e = \frac{dC_e}{dt} + \frac{C_e^S}{\theta} \quad (3.6)$$

Sendo:

C_e = concentração mássica de ésteres etílicos ($\text{g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{g}_{\text{total}}^{-1}$),

C_e^E = concentração mássica de ésteres etílicos na entrada

($g_{\text{ésteres etílicos}} g_{\text{total}}^{-1}$),

C_e^S = concentração mássica de ésteres etílicos na saída

($g_{\text{ésteres etílicos}} g_{\text{total}}^{-1}$),

F = vazão mássica do meio reacional ($g_{\text{total}} h^{-1}$),

V = volume (L),

ρ = massa específica do meio reacional ($g_{\text{total}} L^{-1}$),

θ = tempo de residência médio (h),

t = tempo (h),

r_e = velocidade específica de formação dos ésteres etílicos

($g_{\text{ésteres etílicos}} g_{\text{total}}^{-1} h^{-1}$).

Assumiu-se para o cálculo da velocidade de formação de ésteres etílicos que a estimativa do tempo de residência médio pode ser realizada pelo tempo espacial.

3.2.3.5 Produção do biodiesel em reator tipo leito fixo

A produção de biodiesel em modo contínuo foi realizada em um reator de vidro encamisado com volume útil de 10,5 mL (diâmetro interno de 1,56 cm e comprimento de 5,5 cm) utilizando temperatura de 50 °C controlada por meio de um banho termostático. A coluna foi empacotada com uma suspensão da lipase imobilizada no meio reacional e em seguida estabilizada pela recirculação do substrato através da coluna de modo a eliminar as bolhas de ar formadas durante a etapa do empacotamento da coluna.

A quantidade de enzima utilizada nos experimentos foi de aproximadamente 2,5 g para os ensaios com a lipase Novozym® 435 e 6,7 g para a lipase AK SiO₂-PVA. O substrato, óleo de palma, etanol e solvente (quando presente), foi mantido no tanque de alimentação sob agitação magnética, temperatura controlada e com condensador acoplado; e foi bombeado até o reator de leito fixo com auxílio de uma bomba peristáltica na vazão ajustada. A Figura 3.3 apresenta um esquema do aparato experimental utilizado nos ensaios e a Tabela 3.6 apresenta as condições empregadas nos ensaios com o reator tipo leito fixo.

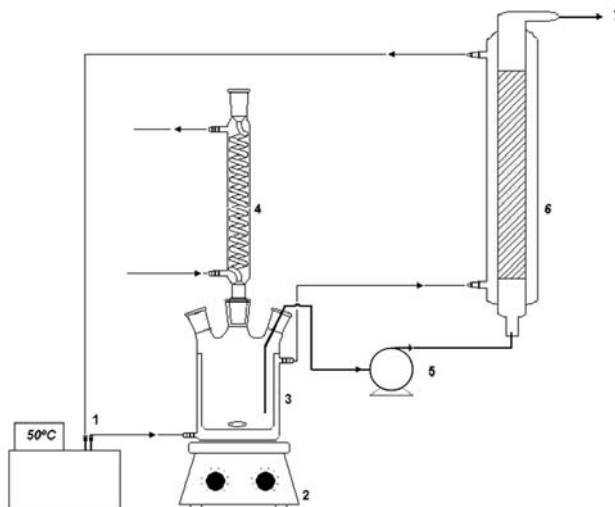


Figura 3.3 Aparato experimental utilizado nos experimentos em modo contínuo de produção de biodiesel com o reator tipo leito fixo. 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Tanque de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Reator tipo leito fixo, 7- Saída de produto.

Tabela 3.6 Condições utilizadas nos experimentos realizados em reator tipo leito fixo utilizando as lipases Novozym® 435 e AK SiO₂-PVA.

Experimento	Razão molar (etanol:óleo)	Enzima	Solvente	Tempo espacial (h)	Vazão (mL min ⁻¹)
5	6:1	Novozym® 435	Ausência	9,6	0,017
6	6:1	AK (SiO ₂ -PVA)	Ausência	5,0	0,020
7	9:1	AK (SiO ₂ -PVA)	Presença	5,5	0,021
				4,6	0,025
				3,7	0,030
8	9:1	AK (SiO ₂ -PVA)	Presença	4,6	0,025
9	9:1	AK (SiO ₂ -PVA)	Ausência	5,5	0,021
				4,4	0,025
10	9:1	Novozym® 435	Ausência	7,0	0,016
11	9:1	Novozym® 435	Presença	6,1	0,019

Todos os ensaios foram realizados a uma vazão constante, exceto os Experimentos 7 e 8, na qual a vazão de alimentação do reator foi variada ao longo da reação. Em todos os experimentos, a alimentação do biorreator foi iniciada no tempo 0 h e foram coletadas amostras diárias a cada 24 h. As amostras foram estocadas a -2 °C até a realização das análises cromatográficas para quantificação dos ésteres de etila.

3.2.3.6 Cálculo da velocidade específica de formação de ésteres etílicos produzidos no reator tipo leito fixo

A partir de um balanço de massa para os ésteres etílicos para um reator tipo leito fixo (Equação 3.7), considerando apenas o fluxo convectivo (Equação 3.10), ou seja, desconsiderando o fluxo dispersivo, pode-se calcular a velocidade específica de formação destes ésteres, conforme apresentado na Equação 3.16.

$$\frac{d(C_e \cdot \rho \cdot A \cdot \varepsilon \cdot dz)}{dt} = \phi_e \cdot A \cdot \varepsilon - (\phi_e + d\phi_e) A \cdot \varepsilon + r_e \cdot \rho \cdot A \cdot \varepsilon \cdot dz \quad (3.7)$$

$$\frac{d(C_e \cdot \rho \cdot dz)}{dt} = -d\phi_e + r_e \cdot \rho \cdot dz \quad (3.8)$$

Apesar da massa específica do meio reacional poder ser variável com relação ao tempo e posição no reator, no presente modelo, que objetiva o cálculo de uma velocidade de reação representativa do processo, ela foi considerada constante e igual a um valor médio também representativo do meio reacional. Desta forma, pode-se escrever que:

$$\frac{dC_e}{dt} = -\frac{1}{\rho} \cdot \frac{d\phi_e}{dz} + r_e \quad (3.9)$$

Sabendo que o fluxo dispersivo é desconsiderado, tem-se:

$$\phi_e = \frac{F \cdot C_e}{A \cdot \varepsilon} - D \frac{d(\rho \cdot C_e)}{dz} \quad (3.10)$$

Aplicando na Equação 3.9, temos:

$$\frac{dC_e}{dt} = -\frac{F}{A.\varepsilon.\rho} \cdot \frac{dC_e}{dz} + r_e \quad (3.11)$$

$$r_e = \frac{dC_e}{dt} + \frac{F}{A.\varepsilon.\rho} \cdot \frac{dC_e}{dz} \quad (3.12)$$

Supondo um perfil aproximadamente linear da concentração de substrato para um determinado tempo, chega-se a:

$$\frac{dC_e}{dz} = \frac{C_e^S - C_e^E}{L} \quad (3.13)$$

Aplicando na Equação 3.12, obtém-se:

$$r_e = \frac{dC_e}{dt} + \frac{F}{A.\varepsilon.\rho} \cdot \frac{C_e^S}{L} \quad (3.14)$$

$$r_e = \frac{dC_e}{dt} + \frac{C_e^S}{\frac{A.L.\varepsilon.\rho}{F}} \quad (3.15)$$

$$r_e = \frac{dC_e}{dt} + \frac{C_e^S}{\theta} \quad (3.16)$$

Sendo:

C_e = concentração mássica de ésteres etílicos ($\text{g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{g}_{\text{total}}^{-1}$),

C_e^E = concentração mássica de ésteres etílicos na entrada ($\text{g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{g}_{\text{total}}^{-1}$),

C_e^S = concentração mássica de ésteres etílicos na saída ($\text{g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{g}_{\text{total}}^{-1}$),

A = área (cm^2),

ε = porosidade,

z = comprimento (cm),

ϕ_e = fluxo de ésteres etílicos ($\text{g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{h}^{-1} \text{m}^{-2}$),

D = coeficiente de dispersão ($\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$),

L = comprimento (cm),

F = vazão mássica ($\text{g}_{\text{total}} \text{h}^{-1}$),

ρ = massa específica ou massa específica média do meio reacional (g cm^{-3}),

θ = tempo de residência médio (h),

t = tempo (h),

r_e = velocidade específica de formação dos ésteres etílicos ($\text{g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{g}_{\text{total}}^{-1} \text{h}^{-1}$).

3.2.3.7 Cálculo do rendimento

O rendimento das reações de produção de biodiesel foi definido como o valor que expressa a massa de ésteres de etila obtida em relação à massa de ésteres de etila teórica (Equação 3.17). A massa de ésteres de etila teórica foi determinada a partir da massa de ácidos graxos presente no óleo de palma alimentado, da massa molecular dos ácidos graxos presente no óleo e dos ésteres de etila. O Apêndice A apresenta os dados utilizados para o cálculo da massa de ésteres teórica.

$$R = \frac{m_{EEo}}{m_{EEt}} \quad (3.17)$$

$$m_{EEt} = \frac{m_{AG} \cdot MM_{EE}}{MM_{AG}} \quad (3.18)$$

$$m_{AG} = m_{\text{óleo}} \cdot C_{AG} \quad (3.19)$$

Sendo:

R = rendimento ($\text{g}_{\text{ésteres etílicos obtida}} \text{g}_{\text{ésteres etílicos teórica}}^{-1}$),

m_{EEo} = massa de ésteres de etila obtida ($\text{g}_{\text{ésteres etílicos obtida}}$),

m_{EEt} = massa de ésteres de etila estequiométrica teórica ($\text{g}_{\text{ésteres etílicos teórica}}$),

m_{AG} = massa de ácido graxo contido no TAG alimentado ($\text{g}_{\text{ácidos graxos alimentado}}$),

MM_{EE} = massa molar média do éster de etila formado ($\text{g}_{\text{éster etílico}} \text{gmol}^{-1}$),

MM_{AG} = massa molar média do ácido graxo contido no TAG

(g ácidos graxos g mol^{-1}),

$m_{\text{óleo}}$ = massa de óleo de palma alimentado (g óleo alimentado),

C_{AG} = concentração mássica de ácido graxo no óleo de palma (g ácido graxo g óleo^{-1}).

3.2.3.8 Cálculo da produtividade

A produtividade foi definida e calculada de acordo com a Equação 3.20. No estado estacionário, a produtividade é igual à velocidade específica de formação de ésteres etílicos obtida pelas Equações 3.6 e 3.16.

$$P = \frac{C_e^S}{\tau} \quad (3.20)$$

Sendo:

P = produtividade ($\text{mg}_{\text{ésteres etílicos}} \text{g}_{\text{totais}}^{-1} \text{h}^{-1}$),

C_e^S = concentração de ésteres etílicos à saída do reator ($\text{mg}_{\text{ésteres etílicos}} \text{g}_{\text{totais}}^{-1}$),

τ = tempo espacial (h).

3.2.3.9 Cálculo da constante de desativação e do tempo de meia vida

A estabilidade operacional das lipases no processo contínuo foi estimada usando o modelo proposto por Sadana (1980). Segundo o autor, o modelo de desativação é descrito pela Equação 3.21 e o tempo de meia vida é definido pela Equação 3.22.

$$a = 1 - 0,5 \cdot K_{ds} \cdot t^2 \quad (3.21)$$

$$t_{1/2} = \left(\frac{\ln 2}{K_{ds}} \right)^{0,5} \quad (3.22)$$

Sendo:

a = atividade residual,

K_{ds} = constante de desativação (h^{-2}),

t = tempo a partir do estado estacionário,

$t_{1/2}$ = tempo de meia vida (dias).

A atividade residual (a) foi obtida pela relação entre a concentração de ésteres à saída do biorreator (C_{Et}) e essa mesma concentração no início do estado estacionário do sistema (C_{E0}). Além de estado estacionário, considerou-se que o fluxo dispersivo foi desprezível frente ao convectivo, que a velocidade de produção do produto é proporcional à concentração de enzima ativa e que no início do estado estacionário a atividade da enzima é máxima.

3.3 MÉTODOS DE ANÁLISE

3.3.1 Atividade enzimática

A atividade enzimática da lipase AK SiO₂-PVA foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia modificada por Soares, De Castro *et al.* (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 50 mL de azeite de oliva e 50 mL de goma arábica a 7% (m/v). Em frascos de Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 5 mL do substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 0,1 g do biocatalisador imobilizado. Os frascos foram incubados a 37 °C por 5 min em banho termostatizado com agitação de 150 rpm. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de mistura de acetona e etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,02 N, utilizando fenolftaleína como indicador.

Para a determinação da atividade enzimática da lipase Novozym® 435 foi utilizada a metodologia adaptada de Bastida, Sabuquillo *et al.* (1998). O substrato foi preparado a partir de uma solução 1% de butirato de metila diluída em tampão fosfato pH 7,0 (20 mM). Em frascos de Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 10 mL de substrato e 0,02 g da lipase. Os frascos foram incubados a 37 °C por 5 min, em banho termostatizado com agitação de 150 rpm. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de mistura de acetona e etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,01 N, utilizando fenolftaleína

como indicador.

Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições de ensaio. As atividades foram expressas em $\text{U g}_{\text{catalisador}}^{-1}$.

3.3.2 Teor de umidade

O teor de água no derivado imobilizado foi medido em balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho modelo ID 50 - Marte.

3.3.3 Propriedades texturais dos biocatalisadores

As propriedades texturais das lipases foram realizadas no equipamento Quantachrome Autosorb-1C na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. A partir do *software* do equipamento foi possível obter os valores da área superficial, volume de poros e tamanho médio dos poros dos biocatalisadores. A área superficial foi calculada segundo o método descrito por Brunauer, Emmett e Teller (BET) e o volume de poros de acordo com o modelo de Barret, Joyner e Halenda (BJH).

3.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises de imagens foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina, no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390 LV Scanning Electron Microscope.

3.3.5 Dosagem dos ésteres etílicos

As concentrações dos ésteres formados nas reações de alcoólise foram determinadas por cromatografia de fase gasosa, utilizando cromatógrafo Modelo GC-3800 Varian (Varian Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, EUA) com detector de ionização de chama e coluna empacotada (5% DEGS em Chromosorb WHP, 80/100 mesh Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), adotando metodologia previamente estabelecida por Urioste, Castro *et al.* (2008). Nitrogênio foi usado como gás de

arraste a um fluxo de 30 mL min^{-1} . As temperaturas do detector e injetor foram de 250 e 230°C , respectivamente. A temperatura da coluna, inicialmente, foi mantida a 120°C por 15 min e, em seguida, aquecida até a temperatura de 170°C numa taxa de $25^\circ\text{C min}^{-1}$. As condições para determinação dos ésteres de etila estão apresentadas na Tabela 3.7. Esta metodologia foi utilizada para quantificação dos ésteres etílicos dos Experimentos 1, 2, 5 a 9 e foram realizadas no Laboratório de Biocatálise da USP - EEL.

Tabela 3.7 Condições para determinação dos ésteres de etila utilizando o CG Varian 3800.

Padrão interno	Hexanol (18 g L ⁻¹)	
Programa de temperaturas da coluna	90 °C (3 min), 120 °C (10 min) e 170 °C (15 min)	
Taxa de variação	25 °C min ⁻¹	
Gás de arraste	Nitrogênio	
Preparação da amostra	1:3 (amostra: hexano)	
Preparação para injeção	1:1 (amostra: padrão interno)	
Tempos de retenção dos Monoésteres de etila (min)	Padrão interno	1,17
	C12 EtOH	8,56
	C14 EtOH	12,06
	C16 EtOH	13,96
	C18 EtOH	17,10
	C18:1 EtOH	17,81
	C18:2 EtOH	19,26

Para quantificação dos ésteres etílicos obtidos nos Experimentos 3, 4, 10 e 11 foi utilizada a metodologia adaptada de Chen, Xiao *et al.* (2009) e as análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos da UFSC. Para tanto foi utilizado cromatógrafo modelo GC-2010AF Shimadzu, equipado com um detector por ionização de chama, um sistema de injeção *split* e uma coluna capilar (RTX-5 $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$, Restek). Nitrogênio foi usado como gás de arraste a um fluxo de 30 mL min^{-1} . As temperaturas do detector e injetor foram de 310 e 290°C , respectivamente. A temperatura da coluna, inicialmente, foi mantida a 150°C por 2 min e, em seguida, aquecida a $10^\circ\text{C min}^{-1}$ até 205°C (3 min), a 2°C min^{-1} até 225°C (1 min) e a $25^\circ\text{C min}^{-1}$ até 275°C . O tempo total da análise foi de $23,5 \text{ min}$. As condições para determinação dos ésteres de etila estão apresentadas na Tabela 3.8. Exemplos de

cromatogramas são apresentados no Apêndice B.

Tabela 3.8 Condições para determinação dos ésteres de etila utilizando o GC-2010AF Shimadzu.

Padrão interno	Salicilato de metila (20 g L ⁻¹)	
Programa de temperaturas da coluna	150 °C (2 min), a 10 °C min ⁻¹ até	
	205 °C (3 min), a 2 °C min ⁻¹ até	
	225 °C (1 min) e a 25 °C min ⁻¹ até	
	275 °C	
Gás de arraste	Nitrogênio	
Preparação da amostra	1:3 (amostra: hexano)	
Preparação para injeção	1:1 (amostra: padrão interno)	
Tempos de retenção dos Monoésteres de etila (min)	Padrão interno	3,47
	C12 EtOH	6,97
	C14 EtOH	9,55
	C16 EtOH	13,43
	C18 EtOH	18,59
	C18:1 EtOH	18,06
	C18:2 EtOH	17,82

3.3.6 Purificação dos ésteres

Para a separação da glicerina liberada na produção do biodiesel, o meio reacional foi submetido a uma etapa de purificação, constituída basicamente de uma lavagem com água destilada. O volume da amostra recolhido foi medido e, em seguida, adicionado o mesmo volume de água destilada aquecida (aproximadamente 60 °C). A mistura foi transferida para um funil de decantação, efetuando-se uma agitação e deixando-a em repouso para a separação das fases. A fase superior, composta pelos ésteres de etila (biodiesel) e acilgliceróis não reagidos, foi submetida à evaporação em rota-evaporador para a retirada do solvente; e a fase inferior composta por glicerol e água de lavagem foi descartada.

3.3.7 Viscosidade do biodiesel

A viscosidade absoluta foi medida em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd., Inglaterra) empregando o cone CP 42 (faixa de viscosidade de 0,3 a 6000 cP) no Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena – USP. As medidas foram feitas em

duplicata a 40 °C empregando 1 mL de amostra. As análises de viscosidade foram realizadas após o processo de purificação.

4. Resultados e Discussão

4.1 PROPRIEDADES DOS BIOCATALISADORES

O conhecimento das propriedades texturais de um catalisador tem grande importância prática, pois a dimensão das partículas influencia diretamente o número e a acessibilidade dos centros ativos. A caracterização da textura dos catalisadores utilizados neste trabalho (área superficial, volume e diâmetro de poros) foi realizada pela análise das isotermas de adsorção utilizando o modelo de BET (Brunauer, Emmett e Teller) para área superficial e o modelo de BJH (Barret, Joyner e Halenda) para volume de poros.

Os resultados dos parâmetros avaliados pelo ensaio de adsorção de nitrogênio para os biocatalisadores estão apresentados na Tabela 4.1, que mostra também as características dos suportes utilizados na imobilização das lipases. As isotermas de adsorção e dessorção obtidas para os biocatalisadores estão apresentadas no Apêndice B.

Tabela 4.1 Análise de BET/BJH dos biocatalisadores e suportes utilizados na imobilização das lipases.

Biocatalisador / Suporte	Área superficial (m ² g ⁻¹)	Volume do poro (cm ³ g ⁻¹)	Diâmetro de poro (Å)
Novozym® 435	82,4	0,4653	225,9
AK SiO ₂ -PVA	234,2	0,1425	24,34
Suporte Lewatit® VP OC 1600 ^b	130	0,50	150
Suporte SiO ₂ -PVA ^a	461	0,275	22,91

^a Santos, Paula *et al.*, 2008; ^b Dalla Rosa, 2009.

Observa-se que a lipase Novozym® 435 apresenta um área superficial inferior a da lipase AK SiO₂-PVA. No entanto, o volume e o diâmetro dos poros da primeira são superiores aos da lipase AK SiO₂-PVA. Apesar da Novozym® 435 ser largamente aplicada na modificação de óleos e gorduras, não foram encontrados dados de área superficial na literatura consultada. A

metodologia empregada na imobilização da lipase AK no suporte híbrido de polissiloxano - álcool polivinílico (SiO_2 -PVA) proporcionou uma excelente área superficial, 3 vezes superior a encontrada para a enzima comercial (Novozym® 435), apesar do diâmetro dos poros serem pequenos.

A determinação da área superficial é de grande importância na avaliação do comportamento de catalisadores. Uma diminuição da atividade de um catalisador pode, de fato, ter origem na diminuição da área específica e, portanto, no número de centros ativos disponíveis e não na alteração da sua atividade específica (Weetall e Pitcher, 1986).

Santos, Paula *et al.* (2008) caracterizaram o suporte híbrido de polissiloxano - álcool polivinílico (SiO_2 -PVA) e encontraram valores de área superficial (BET) de $461 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, diâmetro médio de poros de $22,91 \text{ \AA}$ e volume de poros de $0,275 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Segundo Dalla Rosa (2009) o suporte utilizado na imobilização da enzima Novozym® 435, Lewatit® VP OC 1600, Bayer, apresenta uma área superficial (BET) de $130 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, diâmetro médio do poro de 150 \AA e volume do poro de $0,50 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Percebe-se que em ambos os casos o processo de imobilização da enzima no suporte diminuiu a área superficial.

Além das propriedades texturais dos catalisadores, também foi determinada a massa específica do sólido, sendo que para a lipase AK SiO_2 -PVA o valor foi de $1,84 \text{ g mL}^{-1}$ e para a lipase Novozym® 435 foi $0,69 \text{ g mL}^{-1}$.

4.2 PROCESSO CONTÍNUO DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE PALMA EM REATOR TIPO TANQUE AGITADO COM CESTA

A lipase Novozym® 435 foi utilizada como catalisador na reação de alcoólise enzimática do óleo de palma com etanol na presença e ausência de solvente, com o objetivo de se determinar o comportamento do aparato experimental proposto na produção de biodiesel em modo contínuo, no reator tipo tanque agitado com cesta. No sistema proposto, a enzima ficou confinada em uma cesta para evitar que a agitação magnética vigorosa afetasse as partículas da enzima.

Foram realizados 4 ensaios com este sistema. A Tabela 3.5 apresenta as condições utilizadas em cada experimento.

A Figura 4.1 apresenta o comportamento dinâmico da

concentração de ésteres etílicos, produto da reação enzimática, e da velocidade específica de formação de ésteres etílicos, calculada pela Equação 3.6, para o Experimento 1.

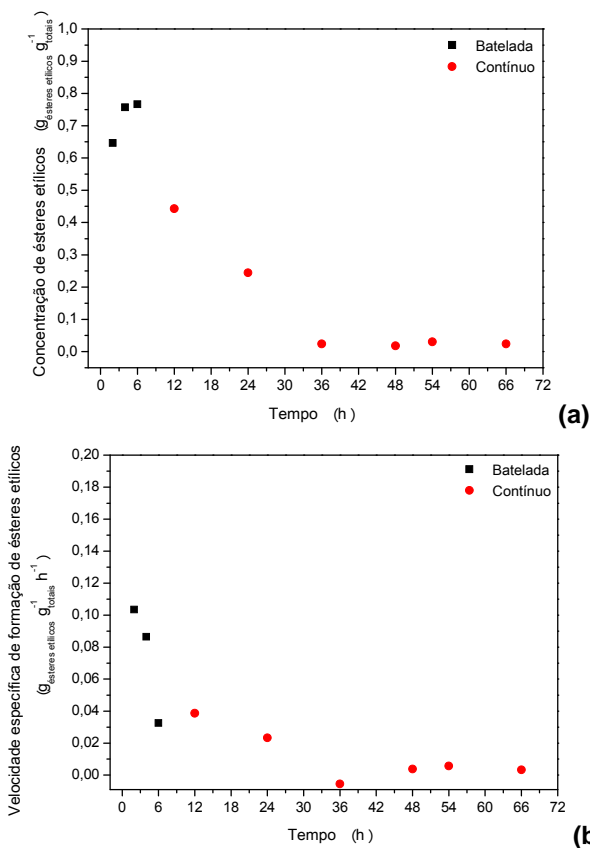


Figura 4.1 Experimento 1 - Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado com cesta operando em modo batelada (primeiras 6 h) e contínuo (temperatura 45 °C, razão molar etanol:óleo 6:1, vazão 0,126 mL min⁻¹, tempo espacial 6 h) empregando-se 5% (m/m) da lipase Novozym® 435 (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.

O primeiro experimento teve duração de 66 h e, como mostra a Figura 4.1a, nas primeiras 6 h de reação, quando o reator

operou em batelada, houve uma acentuada formação de ésteres de etila. Após o início da alimentação, fase contínua, a concentração de ésteres de etila sofreu uma redução acentuada de 42%, nas primeiras 6 h. Na sequência, a concentração mássica dos ésteres de etila reduziu-se a níveis bastantes baixos.

Percebe-se, pela Figura 4.1a, que a reação enzimática é muito rápida, sendo que em 6 h é atingida a concentração máxima de ésteres etílicos ($0,76 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1}$). A velocidade é alta no início ($0,10 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, para $t = 2 \text{ h}$) diminuindo rapidamente, atingindo velocidade específica de produção de ésteres igual a zero, em 36 h de reação (Figura 4.1b). A velocidade específica, que era baixa no final da fase batelada, vai diminuindo gradualmente nas primeiras 20 h do experimento em modo contínuo. Porém, a velocidade cai para níveis bastante baixos ($0,004 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) no estado estacionário que é atingido em 30 h de operação do reator em modo contínuo (Figura 4.1b). Consequentemente, o rendimento de ésteres etílicos (Figura 4.2) é baixo e a concentração de ésteres etílicos no reator em estado estacionário é de apenas $0,024 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1}$.

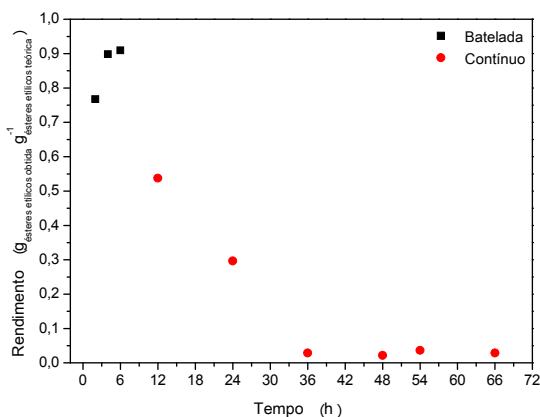


Figura 4.2 Experimento 1 - Rendimento da reação de etanólise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado com cesta operando em modo batelada (primeiras 6 h) e contínuo (temperatura 45°C , razão molar etanol:óleo 6:1, vazão $0,126 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial 6 h) empregando-se 5% (m/m) da lipase Novozym® 435.

As condições utilizadas no Experimento 1 foram repetidas

no Experimento 2 que teve a duração de 48 h. Os resultados de concentração, velocidade específica de formação de ésteres etílicos e rendimento são apresentados nas Figuras 4.3 e 4.4.

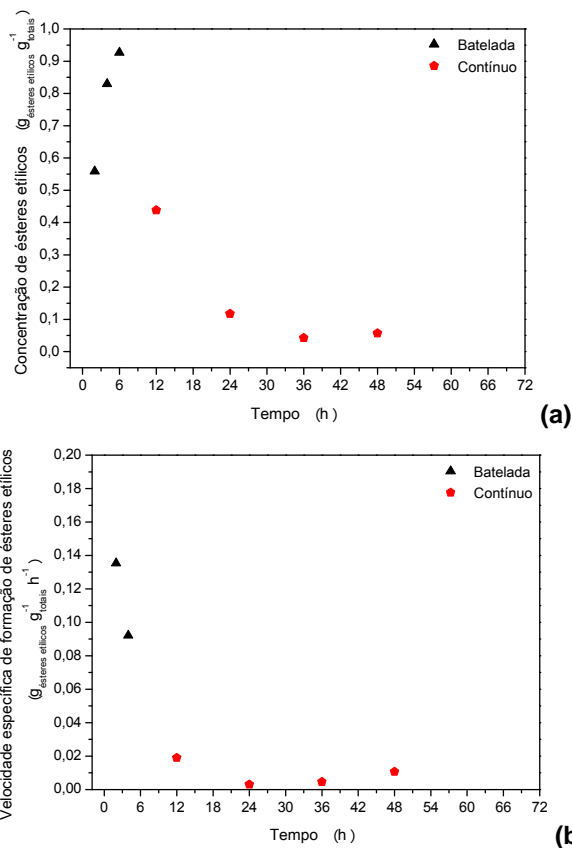


Figura 4.3 Experimento 2 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado com cesta operando em modo batelada (primeiras 6 h) e contínuo (temperatura 45 °C, razão molar etanol:óleo 6:1, vazão 0,126 mL min⁻¹, tempo espacial 6 h) empregando-se 5% (m/m) da lipase Novozym® 435 (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.

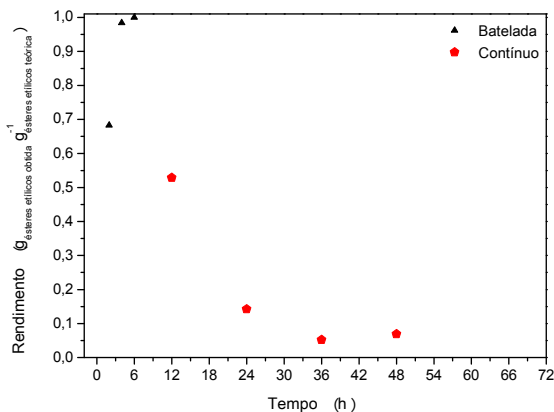


Figura 4.4 Experimento 2 - Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado com cesta operando em modo batelada (primeiras 6 h) e contínuo (temperatura 45 °C, razão molar etanol:óleo 6:1, vazão 0,126 mL min⁻¹, tempo espacial 6 h) empregando-se 5% (m/m) da lipase Novozym® 435.

O comportamento do reator enzimático no Experimento 2 foi similar ao do Experimento 1, indicando a reprodutibilidade dos dados experimentais. A queda na velocidade específica de formação dos ésteres etílicos, parecida com uma reação de 1ª ordem, deve estar ligada à baixa concentração de triglicerídeos (reagente limitante da reação) e não à inativação da enzima. Uma vez que, a conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos foi praticamente total nas primeiras 6 h, em ambos os ensaios, quando o reator estava operando em modo batelada. Além disso, o glicerol, formado durante a operação do reator em modo batelada, não foi retirado do sistema e pode ter ficado aderido à superfície da enzima, dificultando o acesso do substrato ao sítio ativo da lipase.

Este fenômeno já foi observado por Dossat, Combes *et al.* (1999) durante a alcoólise de óleo de girassol com butanol utilizando a Lipozyme IM (lipase *Rhizomucor miehei* imobilizada em Duolite A568). Estes autores postularam que o glicerol forma uma camada hidrofílica em torno da enzima impedindo a transferência de massa de substratos hidrofóbicos. Portanto, durante a reação de alcoólise de triglicerídeos em um processo contínuo, uma perda drástica de desempenho do reator em função do tempo é esperada, devido à adsorção de glicerol

produzido (Severac, Galy *et al.*, 2011).

Para a realização dos Experimentos 3 e 4 foram feitas algumas modificações no aparato experimental na tentativa de aumentar a produção dos ésteres etílicos utilizando o sistema proposto. A primeira modificação foi feita na cesta na qual a enzima estava confinada: a altura dos pés da cesta foi diminuída para que a enzima ficasse totalmente imersa no substrato durante a reação (Figura 4.5), o que não ocorreu nos Experimentos 1 e 2.

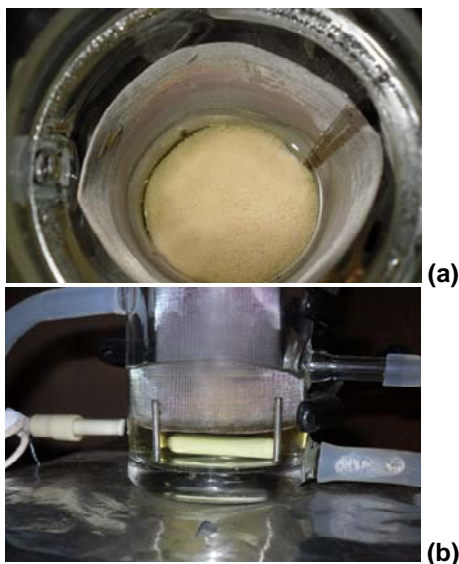


Figura 4.5 (a) Enzima imersa no substrato e (b) confinada na cesta.

Outra adaptação feita no aparato experimental foi que a mangueira de alimentação do reator foi envolvida por uma resistência elétrica flexível, a fim de se evitar possíveis entupimentos; e todo o sistema foi colocado dentro de uma “capela adaptada” e com o auxílio de um aquecedor portátil foi possível manter uma temperatura ambiente média de 35 °C. Estas alterações facilitaram a realização dos Experimentos 3 e 4 já que o óleo de palma possui um ponto de fusão entre 34 e 38 °C. A Figura 4.6 apresenta o aparato experimental antes e depois destas modificações.

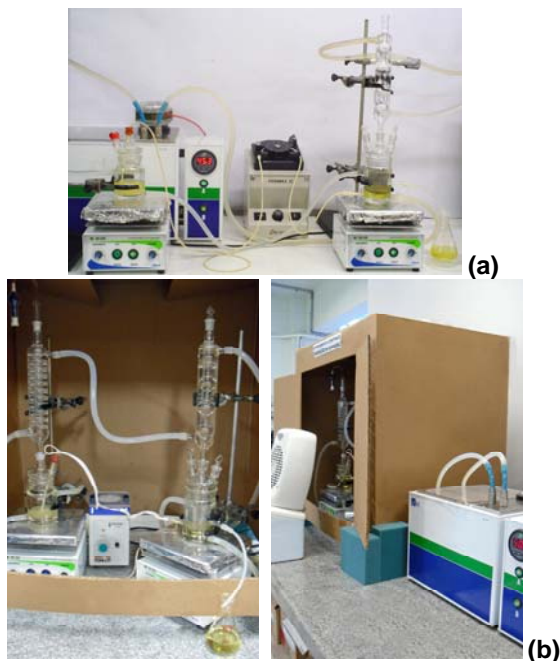


Figura 4.6 (a) Aparato experimental utilizado nos Experimentos 1 e 2
(b) Aparato experimental utilizado nos Experimentos 3 e 4.

Além destas modificações, o modo de *start up* dos experimentos, utilizando este sistema, também foi modificado. Nos Experimentos 1 e 2, nas primeiras 6 h, o sistema operava em modo batelada e após iniciava-se a alimentação contínua; nos Experimentos 3 e 4 a alimentação contínua do substrato iniciou no tempo 0 h. As condições de ensaio também foram modificadas, aumentou-se a razão molar (etanol: óleo de palma) e a temperatura da reação, visando o aumento da produção de ésteres etílicos.

A Figura 4.7 apresenta o comportamento da concentração e da velocidade específica de formação de ésteres etílicos, calculada pela Equação 3.6, para o Experimento 3.

O Experimento 3 alcançou uma concentração máxima de $0,46 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1}$ em 12 h de ensaio e, em aproximadamente, 72 h atingiu o estado estacionário com uma concentração média de ésteres etílicos de $0,26 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1}$. O Experimento 3 teve duração de 214 h, sendo que o estado estacionário teve duração de 142 h.

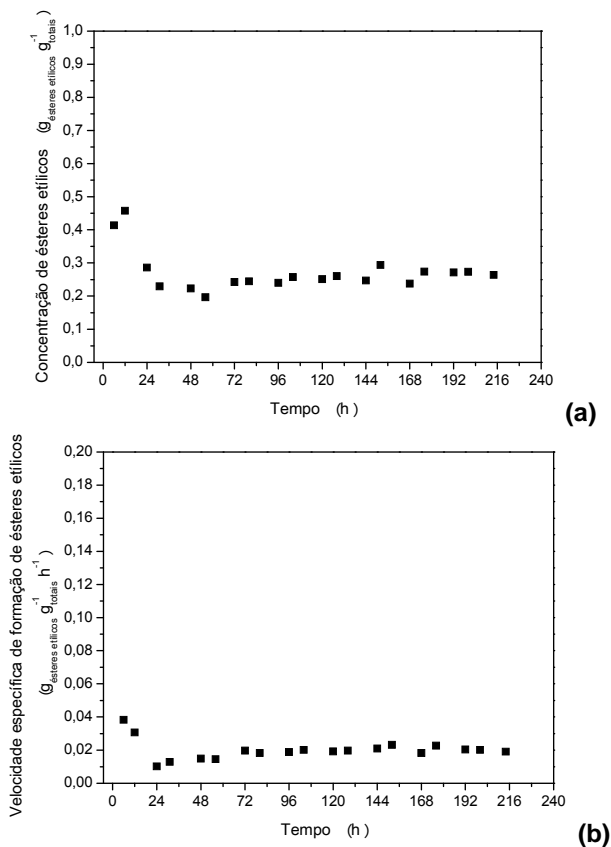


Figura 4.7 Experimento 3 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado com cesta em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, vazão 0,069 mL min⁻¹, tempo espacial 13,4 h) empregando-se 5% (m/m) da lipase Novozym® 435 (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.

A velocidade específica inicial de formação de ésteres etílicos (0,038 $g_{\text{ésteres etílicos}} g_{\text{total}}^{-1} h^{-1}$, para $t = 6$ h) diminuiu rapidamente, segundo uma reação de 1^a ordem, atingindo o estado estacionário e permanecendo com uma velocidade específica média de 0,02 $g_{\text{ésteres etílicos}} g_{\text{total}}^{-1} h^{-1}$ até o final do experimento. Observa-se que com a alteração do modo de *start up* dos experimentos o estado estacionário foi atingido,

permanecendo por um longo período com uma produção satisfatória de ésteres etílicos. A Figura 4.8 mostra que o rendimento médio da reação no estado estacionário foi de $0,35 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos obtida}} \text{ g}_{\text{ésteres etílicos teórica}}^{-1}$.

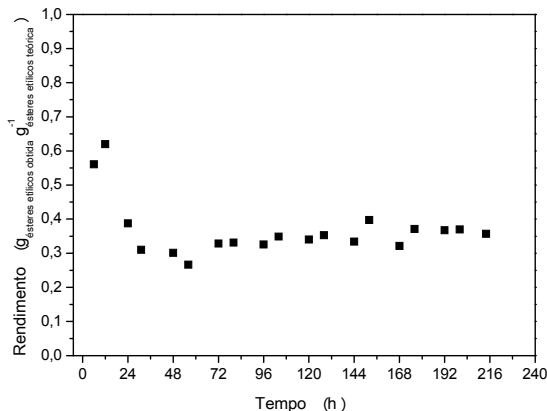


Figura 4.8 Experimento 3 - Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado com cesta em modo contínuo (temperatura 50°C , razão molar etanol:óleo 9:1, vazão $0,069 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial 13,4 h) empregando-se 5% (m/m) da lipase Novozym® 435.

Solventes podem ser utilizados em meios reacionais, tanto para solubilizar os reagentes como também para diminuir a viscosidade do meio. Segundo Dossat, Combes *et al.* (1999) problemas de solubilização resultam na adsorção de moléculas polares no suporte hidrofílico levando a baixas taxas de alcoólise. O solvente utilizado neste trabalho, terc-butanol, foi selecionado tomando por base dados descritos na literatura (Wang, Du *et al.*, 2006; Royon, Daz *et al.*, 2007; Halim e Kamaruddin, 2008; Halim, Kamaruddin *et al.*, 2009). A proporção de solvente utilizada baseou-se no trabalho realizado por Royon, Daz *et al.* (2007). Terc-butanol é um solvente não-tóxico e relativamente de baixo custo e apresenta um baixo ponto de ebulição (82°C) em comparação com outros solventes de média polaridade, o que facilita sua separação e recuperação durante o processo a júsante (Severac, Galy *et al.*, 2011).

No Experimento 4 foi adicionado ao substrato o solvente, terc-butanol, para avaliar sua influência na produção de ésteres

etílicos. A Figura 4.9 mostra o comportamento da concentração e a velocidade específica de formação de ésteres etílicos, calculada pela Equação 3.6, para o Experimento 4.

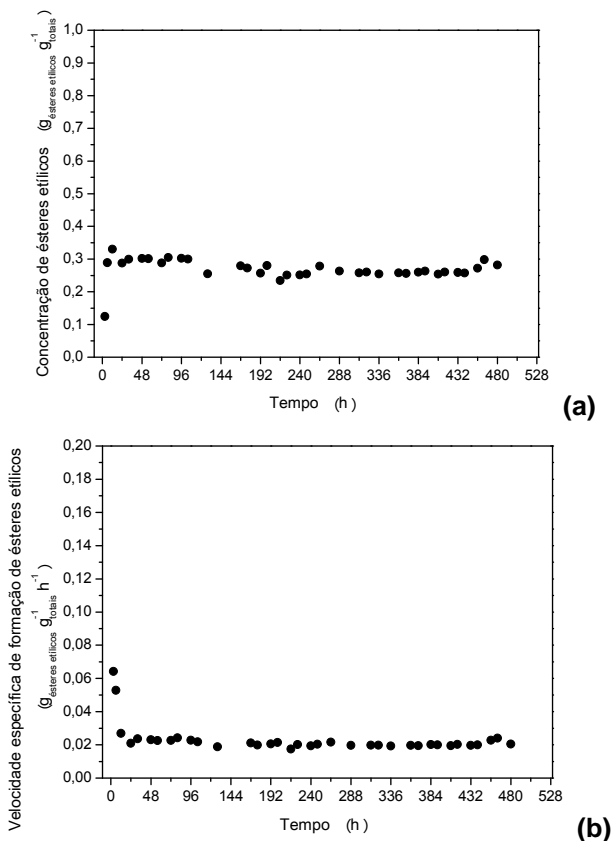


Figura 4.9 Experimento 4 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado com cesta em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, 30% (v/v) em relação ao óleo de palma de terc-butanol, vazão 0,07 mL min⁻¹, tempo espacial 13,1 h) empregando-se 5% (m/m) da lipase Novozym® 435 (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.

No Experimento 4 foi alcançada uma concentração máxima de $0,33 g_{\text{ésteres etílicos}} / g_{\text{total}}$ em 12 h de ensaio e em

aproximadamente 32 h foi atingido o estado estacionário com uma concentração média de ésteres etílicos de $0,27 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1}$. O experimento durou 480 h, sendo que entre 104 e 192 h de ensaio problemas de entupimento da mangueira de alimentação do reator tornaram o sistema instável, após o sistema retornou novamente ao estado estacionário.

O comportamento da velocidade específica de formação de ésteres etílicos foi semelhante ao observado no ensaio sem solvente (Experimento 3). A velocidade específica inicial foi de $0,064 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, para $t = 3 \text{ h}$ e no estado estacionário a velocidade específica média foi a mesma obtida no Experimento 3 ($0,02 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). A adição de solvente ao substrato não provocou alterações na velocidade específica de formação dos ésteres etílicos, no entanto o rendimento médio da reação no estado estacionário teve um aumento de 37% quando comparado ao rendimento obtido no Experimento 3 (Figura 4.10).

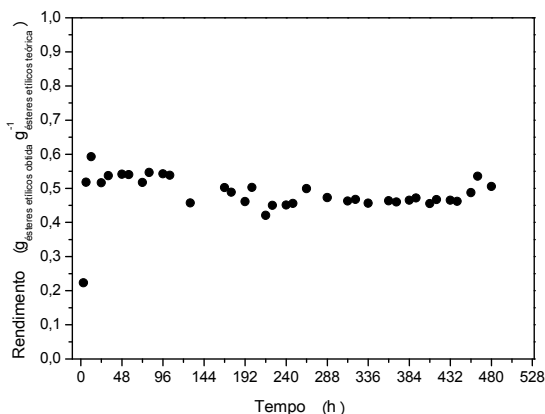


Figura 4.10 Experimento 4 - Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado com cesta em modo contínuo (temperatura 50°C , razão molar etanol:óleo 9:1, 30% (v/v) em relação ao óleo de palma de terc-butanol, vazão $0,07 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial 13,1 h) empregando-se 5% (m/m) da lipase Novozym® 435.

Apesar da concentração e da velocidade específica de formação dos ésteres etílicos dos Experimentos 3 e 4 serem as mesmas, ocorreu um aumento no rendimento do ensaio realizado na presença de solvente (Experimento 4) quando comparado ao

ensaio livre de solvente (Experimento 3). Este aumento no rendimento é devido à diluição dos substratos na entrada do reator causada pela adição do solvente no meio reacional.

4.3 PROCESSO CONTÍNUO DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE PALMA EM REATOR TIPO LEITO FIXO

As lipases Novozym® 435 e *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (AK SiO₂-PVA), foram utilizadas como catalisador na reação de alcoólise enzimática do óleo de palma com etanol na presença e ausência de solvente, com o objetivo de determinar o comportamento da produção de biodiesel no reator tipo leito fixo, em modo contínuo.

A literatura reporta algumas vantagens da utilização de um reator de leito fixo na produção de biodiesel. Entre elas cita-se a remoção contínua de glicerol e excesso de álcool, a reutilização eficaz de enzimas e a proteção das partículas de enzima contra o cisalhamento e estresse (Royon, Daz *et al.*, 2007; Nielsen, Brask *et al.*, 2008; Robles-Medina, Gonzalez-Moreno *et al.*, 2009).

Foram realizados 7 ensaios utilizando o reator tipo leito fixo e as condições reacionais estão apresentadas na Tabela 3.6.

O aparato experimental destes ensaios foi montado dentro de uma capela com utilização de um aquecedor portátil da mesma forma que foram conduzidos os experimentos realizados no reator tipo tanque agitado com cesta.

O primeiro experimento realizado com o reator de leito fixo, Experimento 5, utilizou como catalisador a lipase Novozym® 435 (2,35 g massa seca), razão molar (etanol: óleo de palma) 6:1, ausência de solvente e temperatura de 50 °C. Neste ensaio utilizou-se fluxo descendente de alimentação do substrato a uma vazão de 0,017 mL min⁻¹ e o volume do reator de 13,25 mL.

A Figura 4.11 apresenta o comportamento dinâmico da concentração de ésteres etílicos, produto da reação enzimática, e da velocidade específica de formação destes ésteres, calculada pela Equação 3.16, para o Experimento 5.

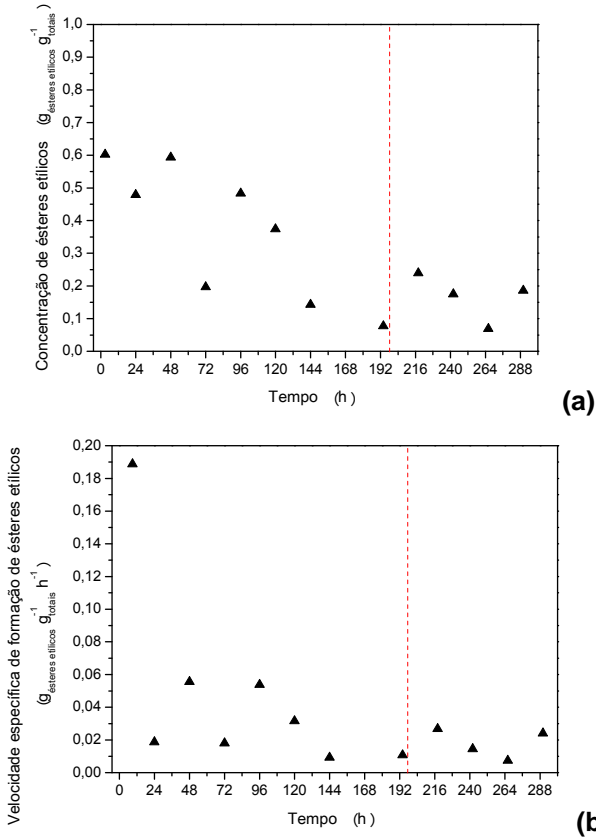


Figura 4.11 Experimento 5 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 6:1, vazão 0,017 mL min⁻¹, tempo espacial 9,6 h, adição de Triton X-100 10% (m/v) em relação ao substrato em 194 h de reação) empregando-se a lipase Novozym® 435 (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.

O Experimento 5 teve a duração de 290 h, alcançando uma concentração máxima de 0,60 $g_{\text{ésteres etílicos}} g_{\text{total}}^{-1}$ em 9 h de ensaio caindo gradualmente até atingir valores bastante baixos (0,08 $g_{\text{ésteres etílicos}} g_{\text{total}}^{-1}$ em 194 h). Em 194 h decidiu-se adicionar um surfactante, Triton X-100 na proporção 10% (m/v) em relação ao substrato, a fim de evitar a separação de fases do substrato na entrada do reator. Triton é um surfactante não iônico, apresentando-

se como um líquido viscoso na temperatura ambiente, com aparência amarelo claro, sendo frequentemente, utilizado em aplicações bioquímicas para solubilizar proteínas (Sigma, 2009). A adição do Triton X-100 evitou a separação de fases, no entanto, não foi possível observar uma resposta satisfatória com relação à produção de ésteres etílicos.

A velocidade específica inicial de formação de ésteres etílicos foi de $0,18 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em 9 h e, a partir de 24 h até o final do ensaio, a velocidade oscilou entre 0,05 e $0,007 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A Figura 4.12 mostra o rendimento do Experimento 5, sendo possível observar que o estado estacionário não foi atingido.

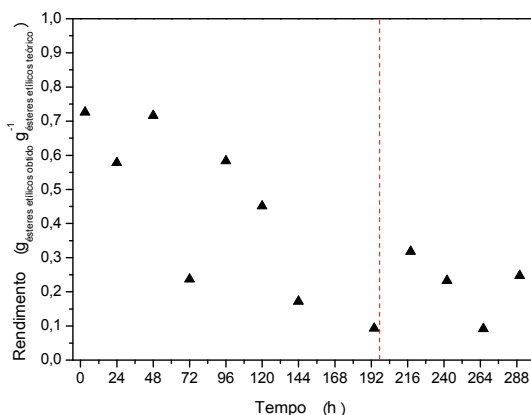


Figura 4.12 Experimento 5 - Rendimento da reação de etanólise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50°C , razão molar etanol:óleo 6:1, vazão $0,017 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial 9,6 h, adição de Triton X-100 10% (m/v) em relação ao substrato em 194 h de reação) empregando-se a lipase Novozym® 435.

Como primeiro ensaio realizado em reator de leito fixo foi possível identificar alguns problemas operacionais, como a formação de bolhas de ar na entrada do reator, provavelmente devido ao fluxo descendente; entupimento da mangueira de alimentação; formação de caminhos preferenciais no leito e formação de duas fases na entrada do reator. A Figura 4.13 ilustra algumas destas dificuldades observadas ao longo do experimento.

No Experimento 6, utilizou-se como catalisador a lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (AK SiO₂-PVA) (6,73 g massa seca), razão molar (etanol: óleo de palma) 6:1, ausência de solvente, adição de Triton X-100 na proporção 10% (m/v) em relação ao substrato e temperatura de 50 °C. Neste ensaio foi utilizado fluxo ascendente de alimentação do substrato a uma vazão de 0,020 mL min⁻¹ e reator com um volume de 9,71 mL.

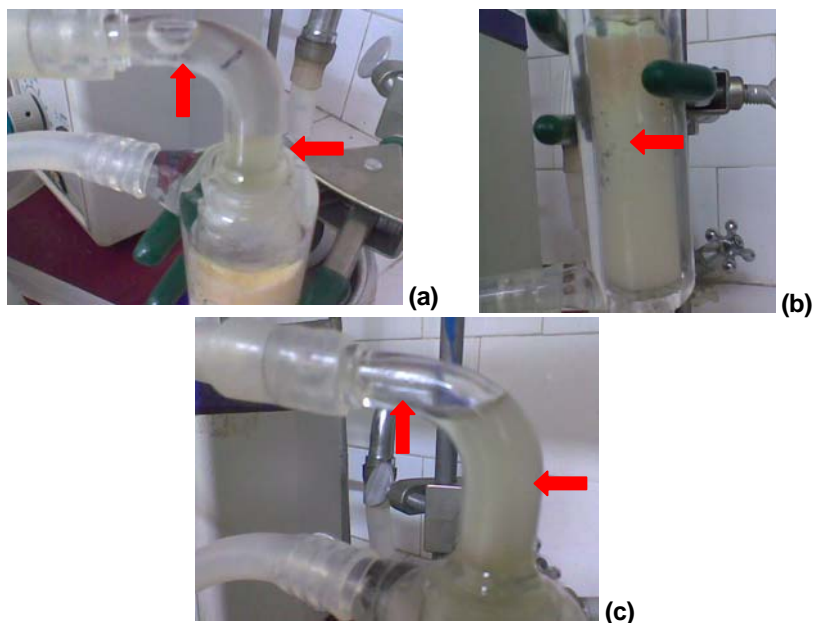


Figura 4.13 Experimento 5 – (a) Formação de bolha de ar na entrada do reator e de duas fases no substrato alimentado. (b) Formação de caminhos preferenciais no leito. (c) Substrato alimentado sem a formação de fases (após adição do surfactante Triton X-100) e bolha de ar na entrada do reator.

Como a adição do Triton X-100, no final do Experimento 5, evitou a separação de fases, decidiu-se testar esta estratégia desde o início do Experimento 6. Para o problema da formação de bolhas na entrada do reator, testamos a mudança do fluxo de alimentação do reator de descendente para ascendente. Outra alteração importante realizada no aparato experimental foi a

utilização de uma resistência elétrica flexível envolvendo a mangueira de alimentação do reator de leito fixo, a fim de evitar possíveis entupimentos. A Figura 4.14 ilustra o aparato experimental utilizado no Experimento 6.



Figura 4.14 Experimento 6 – Aparato experimental utilizado no Experimento 4, destacando a utilização da resistência elétrica envolvendo a mangueira de alimentação.

A Figura 4.15 apresenta o comportamento dinâmico da concentração de ésteres etílicos e da velocidade de formação destes ésteres para o Experimento 6, que teve a duração de 167 h. Observa-se que em 6 h de ensaio foi alcançada a concentração máxima ($0,74 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1}$), em seguida houve uma queda e em 48 h foi atingido o estado estacionário com uma concentração média de $0,11 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1}$. Na Figura 4.16b verifica-se que a velocidade específica inicial de formação de ésteres etílicos, calculada pela Equação 3.16, foi de $0,20 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em 3 h, e no estado estacionário a velocidade específica média foi de $0,02 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

A adição de Triton X-100 foi relatada como uma estratégia bem sucedida para aumentar a atividade da lipase na glicerólise do azeite de oliva utilizando a Novozym® 435 em reações batelada (Valério, Rovani *et al.*, 2009).

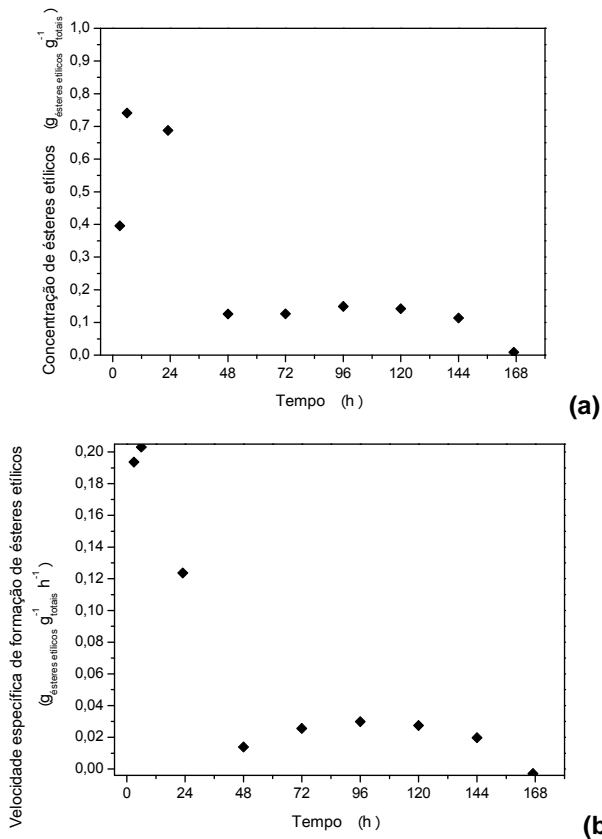


Figura 4.15 Experimento 6 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanolíse enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 6:1, adição de Triton X-100 na proporção 10% (m/v) em relação ao substrato, vazão 0,020 mL min⁻¹, tempo espacial 5,0 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.

No presente estudo, a adição de 10% (m/v) de Triton X-100 ao substrato resolveu o problema da separação de fases. No entanto, esta adição promoveu uma redução acentuada na formação dos ésteres etílicos. A queda na concentração de ésteres, mostrada na Figura 4.15, pode estar associada à dessorção da lipase do suporte SiO₂-PVA devido à ação do Triton X-100 e essa possibilidade foi verificada a partir da

comparação da estrutura morfológica da enzima imobilizada original e após a reação, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Conforme mostrado na Figura 4.16, a enzima imobilizada antes de sua utilização mostra uma estrutura típica da superfície do suporte em que a enzima foi fixada (Figura 4.16a) e, após seu uso, parece que a enzima foi desprendida do suporte, aumentando desta forma a possibilidade de esta ser completamente desSORVIDA e lavada para fora do reator (Figura 4.16b).

Esse comportamento está de acordo com os resultados obtidos (Figura 4.15), mostrando uma diminuição gradual das concentrações dos ésteres etílicos até quase nenhuma formação de éster detectada após 167 h de operação, e também com a Figura 4.17 que mostra que o rendimento médio no estado estacionário foi de $0,16 \text{ g ésteres etílicos obtida g ésteres etílicos teórica}^{-1}$.

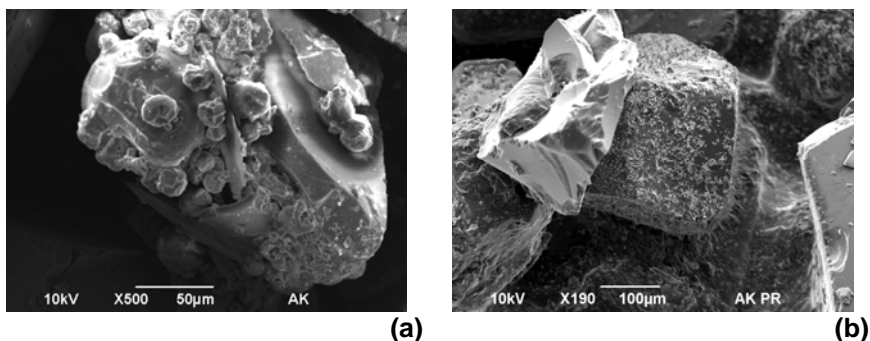


Figura 4.16 Experimento 6 - MEV (a) Biocatalisador original antes da reação e (b) biocatalisador após a reação. Reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 6:1, adição de Triton X-100 na proporção 10% (m/v) em relação ao substrato, vazão $0,020 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial 5,0 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA.

O Triton, por ser um tensoativo, possui tanto a parte hidrofílica (cabeça) como a hidrofóbica (cauda), e quando em contato com a lipase, esta se dispõe na sua conformação aberta, deixando seu sítio ativo exposto. Segundo Fernandez-Lorente, Palomo *et al.* (2007), a parte hidrofóbica do Triton adere ao sítio ativo da lipase, podendo ocasionar uma distorção da enzima ou uma inibição da sua atividade catalítica (inibição competitiva),

ocorrendo uma competição entre o Triton e o substrato, dificultando o acesso do substrato ao sítio ativo da lipase e limitando a formação de produto. Entretanto, esse comportamento é dependente do tipo de suporte de imobilização usado no preparo do sistema imobilizado, como descrito no trabalho publicado por Cabrera, Fernandez-Lorente *et al.* (2009) para a *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em diferentes suportes. Segundo esses autores, os derivados imobilizados CALB foram completamente dessorvidos do suporte hidrofóbico após incubação do biocatalisador com Triton X-100. A concentração adequada de detergente para a plena dessorção da enzima mostrou ser dependente do tipo de suporte, variando de 1% para o butil-agarose a 4% para o octadecil-Sepabeads.

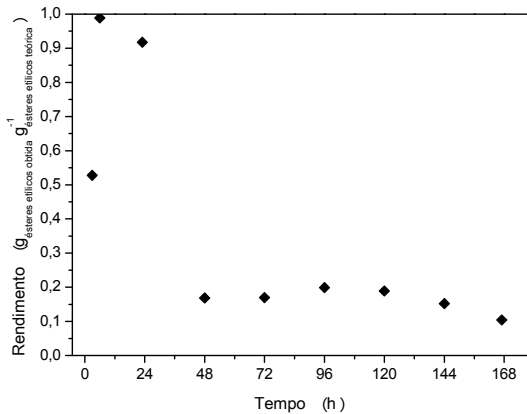


Figura 4.17 Experimento 6 - Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 6:1, adição de Triton X-100 na proporção 10% (m/v) em relação ao substrato, vazão 0,020 mL min⁻¹, tempo espacial 5,0 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA.

O efeito da dessorção da lipase do suporte também foi relatado para lipase de *Candida rugosa* imobilizada em fosfato de zircônio, quando utilizada em bateladas sequenciais na hidrólise de p-nitrofenilpalmitato (p-NPP) emulsificado com Triton (Mendes, Barbosa *et al.*, 2007); após 12 ciclos, a atividade hidrolítica do biocatalisador diminuiu 80% em relação à atividade inicial, o que foi atribuído à ligação da lipase pela ação do Triton, que mais uma vez está de acordo com os resultados obtidos no

presente estudo.

A utilização de surfactantes na produção de biodiesel, relatadas na literatura, está relacionada com o melhoramento das propriedades do biocombustível. Wang, Ma *et al.* (2011) realizaram estudo de adição de surfactantes ao biodiesel a fim de melhorar o desempenho do biocombustível a baixas temperaturas, ou seja, reduzir o ponto de entupimento de filtro a frio (*cold filter plugging point*). Um combustível adequado para baixas temperaturas ambientes deve ter um baixo ponto de entupimento de filtro a frio. No estudo, os autores obtiveram a maior redução do ponto de entupimento de filtro a frio com a adição de 0,02% em massa do éster de poliglicerol.

As modificações realizadas no Experimento 6, em termos de aparato experimental, melhoraram o desempenho do reator. Porém, com o baixo rendimento houve problemas de entupimentos na coleta do produto (saída do reator de leito fixo). Mesmo com a mudança do fluxo de alimentação para ascendente, o problema de entrada de ar no reator de leito fixo não foi resolvido totalmente. Acredita-se que estas bolhas provêm do tanque de alimentação que utiliza agitação magnética vigorosa para homogeneizar o substrato. A Figura 4.18 a mostra a bolha de ar entre a placa porosa e o leito de enzima. Durante o ensaio esta bolha, se deslocava provocando rachaduras no leito e formação de caminhos preferenciais (Figura 4.18b e c).

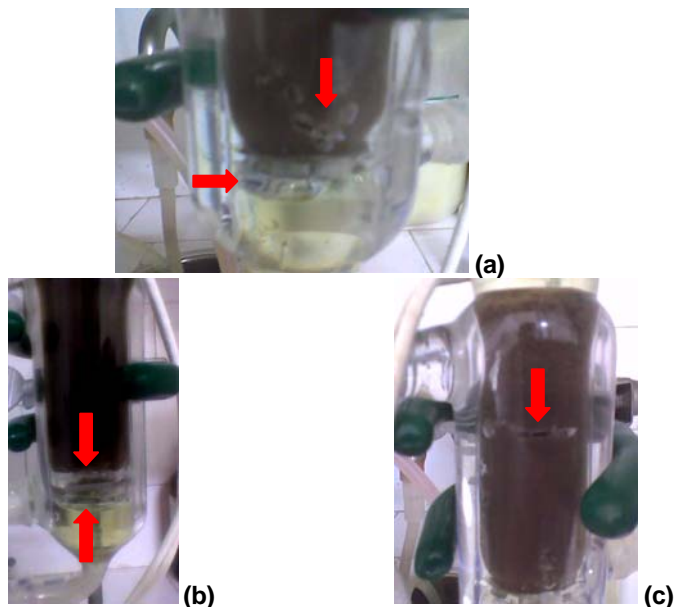


Figura 4.18 Experimento 6 – (a) Bolhas no reator de leito fixo. (b) Rachadura no leito provocada pelo deslocamento das bolhas. (c) Leito de enzima deslocado devido às bolhas de ar.

A estratégia de adição do Triton X-100 não forneceu o resultado desejado em termos de produção de ésteres etílicos, então se optou pelo aumento da razão molar (etanol: óleo de palma) e adição de solvente ao substrato, para melhorar a homogeneização do meio reacional, evitar a separação de fases e aumentar o rendimento do produto.

Para o Experimento 7 utilizou-se como catalisador a lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (AK SiO₂-PVA) (6,73 g massa seca), razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, presença do solvente terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, temperatura de 50 °C e o volume do reator de 10,5 mL. Utilizou-se fluxo ascendente de alimentação do substrato com variação da vazão ao longo do ensaio entre 0,021 e 0,030 mL min⁻¹, correspondendo a tempos espaciais de 5,5 a 3,7 h, respectivamente, a fim de se definir os limites de operação em termos de vazão volumétrica do substrato.

A Figura 4.19 apresenta o comportamento dinâmico da

concentração de ésteres etílicos. A Figura 4.20 mostra a velocidade específica de formação dos ésteres, calculada pela Equação 3.16, para o Experimento 7 que teve duração de 530 h.

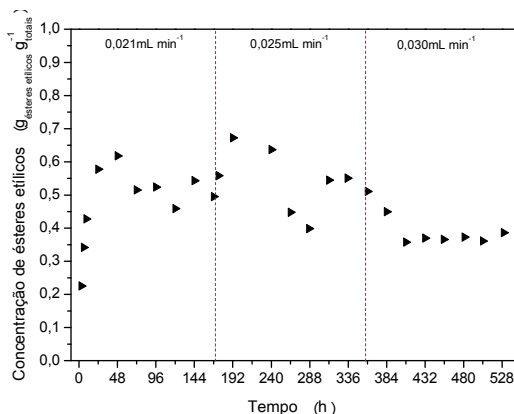


Figura 4.19 Experimento 7 - Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanólise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, adição de terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão 0,021 a 0,030 mL min⁻¹, tempo espacial de 5,5 a 3,7 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA.

Analisando as Figuras 4.19 e 4.20, verificou-se que, para a vazão de 0,021 mL min⁻¹, o estado estacionário foi atingido em 72 h, permaneceu por 96 h com concentração média de 0,51 g_{ésteres etílicos} g_{total}⁻¹ e velocidade específica média de 0,093 g_{ésteres etílicos} g_{total}⁻¹ h⁻¹. Os maiores valores, tanto para concentração como para velocidade específica de formação de ésteres etílicos, foram obtidos na vazão de 0,025 mL min⁻¹, correspondendo a um tempo espacial de 4,6 h. Nesta condição foi obtida a concentração máxima de ésteres etílicos de 0,67 g_{ésteres etílicos} g_{total}⁻¹ e a velocidade específica máxima de produção foi de 0,14 g_{ésteres etílicos} g_{total}⁻¹ h⁻¹ entre 174 e 240 h de ensaio. Não foi possível observar o estado estacionário uma vez que a vazão foi alterada antes de sua formação, no entanto supõe-se que o início deste estado estacionário seria no tempo de 312 h de reação. Para a vazão de 0,030 mL min⁻¹, o estado estacionário foi atingido em 408 h de ensaio e teve a duração de 122 h com uma concentração média de 0,37 g_{ésteres etílicos} g_{total}⁻¹ e

uma velocidade específica média de formação de ésteres etílicos de $0,098 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

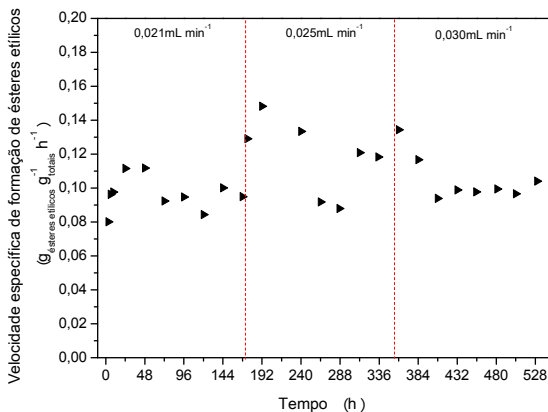


Figura 4.20 Experimento 7 – Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos obtida da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, adição de terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão 0,021 a 0,030 mL min⁻¹, tempo espacial de 5,5 a 3,7 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA.

Na Figura 4.21 foram plotados os valores médios de produtividade e concentração de produto formado (ésteres etílicos) no estado estacionário para as vazões testadas. Verificou-se que quando a vazão foi aumentada de 0,021 para 0,025 mL min⁻¹, houve o aumento da produtividade de 93 para 119 mg_{ésteres etílicos} g_{total}⁻¹ h⁻¹ e também um aumento na concentração de ésteres formados de 8%. Um novo aumento na vazão (0,030 mL min⁻¹) provocou uma queda na produtividade (99 mg_{ésteres etílicos} g_{total}⁻¹ h⁻¹) e na concentração de ésteres etílicos formados de 33%.

De acordo com a Figura 4.21, verificou-se que o funcionamento do reator de leito fixo teve o melhor desempenho para o tempo espacial igual a 4,6 h (vazão de 0,025 mL min⁻¹), nas condições testadas. Produtividade de 119 mg_{ésteres etílicos} g_{total}⁻¹ h⁻¹ foram alcançadas com elevado rendimento de ésteres etílicos, como mostra a Figura 4.22, superior a 0,55 g_{ésteres etílicos} obtida g_{ésteres etílicos teórica}⁻¹ durante todo o experimento.

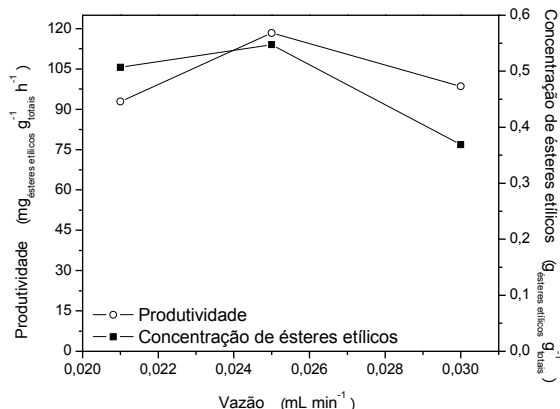


Figura 4.21 Experimento 7 – Produtividade e concentração de ésteres etílicos no estado estacionário obtidos da reação de etanólise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, adição de terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão 0,021 a 0,030 mL min⁻¹, tempo espacial de 5,5 a 3,7 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA.

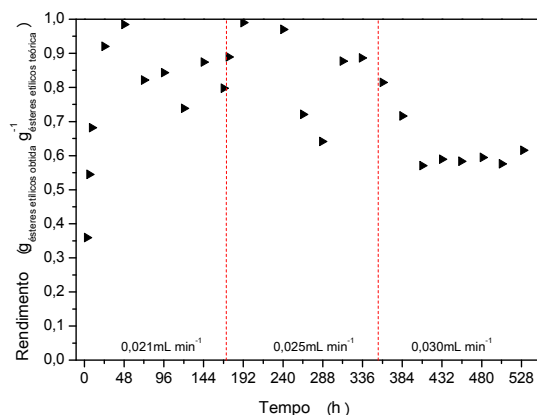


Figura 4.22 Experimento 7 – Rendimento da reação de etanólise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, adição de terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão 0,021 a 0,030 mL min⁻¹, tempo espacial de 5,5 a 3,7 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA.

As condições de reação utilizadas no Experimento 7 foram repetidas no Experimento 8, exceto a variação da vazão de alimentação que foi mantida constante ($0,025 \text{ mL min}^{-1}$). Logo, utilizou-se como catalisador a lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (AK SiO_2 -PVA) (6,70 g massa seca), razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, presença do solvente terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, temperatura de 50°C e volume do reator de 10,5 mL.

A Figura 4.23 apresenta o comportamento dinâmico da concentração de ésteres etílicos e da velocidade específica de formação destes ésteres para o Experimento 8, que teve duração de 504 h.

Conforme a Figura 4.23a em 72 h de ensaio foi alcançada a concentração máxima ($0,65 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1}$). Em seguida houve uma queda e em 240 h foi atingido o estado estacionário com uma concentração média de $0,41 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1}$. Na Figura 4.23b, verifica-se que a velocidade específica de formação de ésteres etílicos, calculada pela Equação 3.16, foi máxima de $0,15 \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em 72 h, e no estado estacionário a velocidade específica média foi de $0,09 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Comparando com os resultados de concentração e velocidade específica de formação de ésteres etílicos obtidos no Experimento 7 ($0,67 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1}$ e $0,14 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$), para a mesma vazão, observa-se similaridade dos valores máximos obtidos, apesar de não se ter atingido o estado estacionário no Experimento 7.

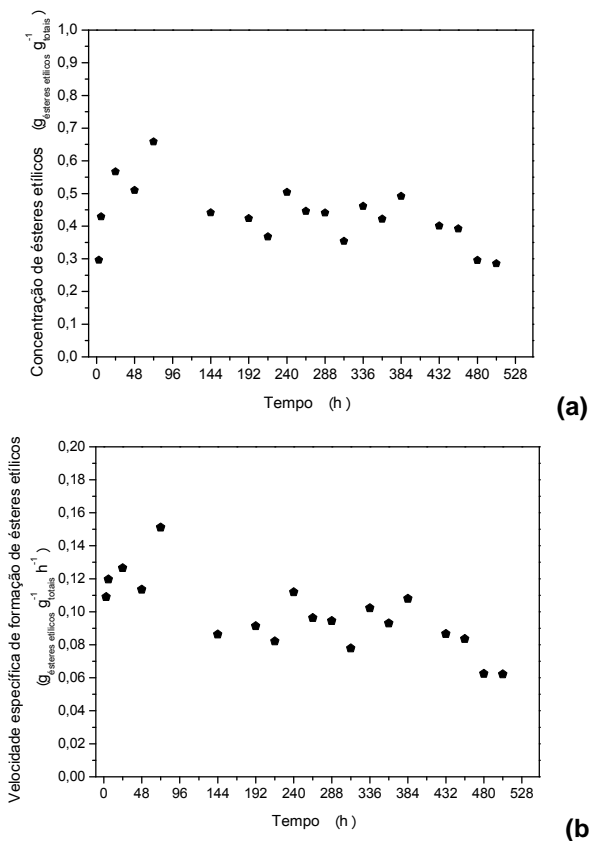


Figura 4.23 Experimento 8 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanólise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, presença do solvente terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão 0,025 mL min⁻¹, tempo espacial 4,6 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.

A Figura 4.24 mostra que o rendimento da reação foi superior a 0,60 $g_{\text{ésteres etílicos}} g_{\text{ésteres etílicos teórica}}^{-1}$ na maior parte do tempo do Experimento 8, corroborando com o resultado obtido no Experimento 7.

Conclui-se que os resultados são reprodutíveis e é possível produzir biodiesel em biorreator do tipo leito fixo utilizando a lipase

AK SiO₂-PVA na presença de solvente obtendo rendimentos superiores a 0,6 g ésteres etílicos obtida g ésteres etílicos teórica⁻¹ utilizando a vazão de 0,025 mL min⁻¹.

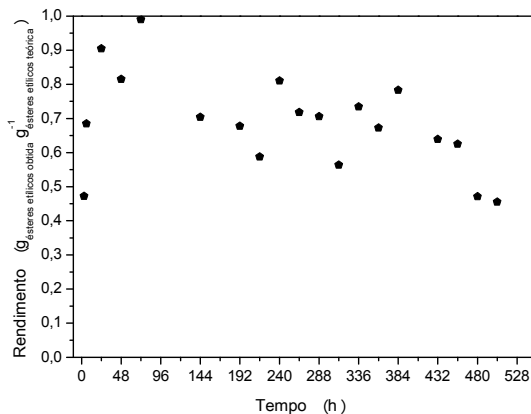


Figura 4.24 Experimento 8 – Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, adição de terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão 0,025 mL min⁻¹, tempo espacial 4,6 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA.

Para avaliar o efeito do uso do solvente terc-butanol, realizou-se o Experimento 9 na ausência do solvente. Foi utilizada a lipase de *Pseudomonas fluorescens*, imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (AK SiO₂-PVA) (6,70 g massa seca), razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1 e temperatura de 50 °C. Aplicou-se fluxo ascendente de alimentação do substrato com variação da vazão ao longo do ensaio de 0,021 e 0,025 mL min⁻¹, correspondendo a tempos espaciais de 5,5 e 4,4 h, respectivamente, e o volume do reator de 10,5 mL.

A Figura 4.25 apresenta o comportamento dinâmico da concentração de ésteres etílicos e da velocidade específica de formação destes ésteres para o Experimento 9 que teve a duração de 504 h.

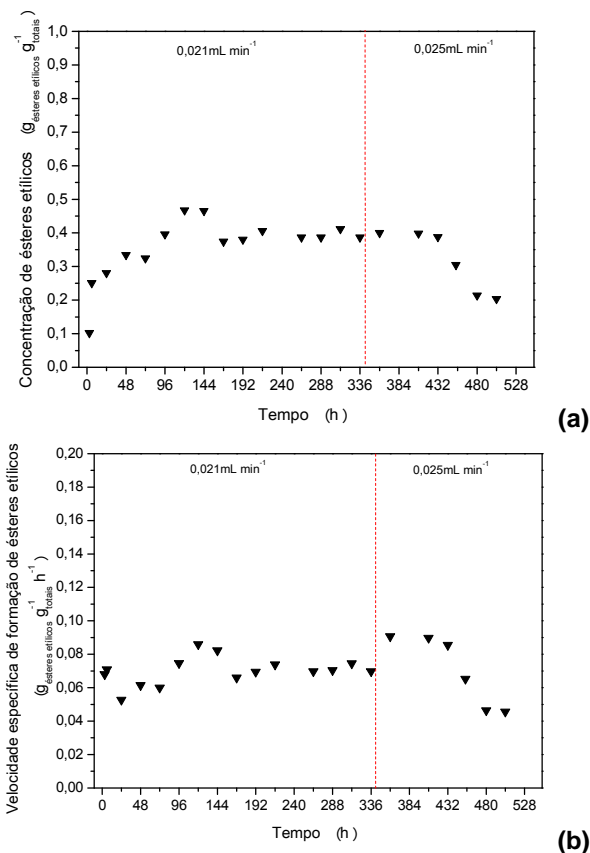


Figura 4.25 Experimento 9 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanólise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, ausência de solvente, vazão 0,021 e 0,025 mL min⁻¹, tempo espacial de 5,5 e 4,4 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA. (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.

De acordo com a Figura 4.25a em 120 h de ensaio foi alcançada a concentração máxima (0,47 $g_{\text{ésteres etílicos}} / g_{\text{total}}$) e o estado estacionário foi atingido em 168 h com uma concentração média de 0,39 $g_{\text{ésteres etílicos}} / g_{\text{total}}$, para vazão de 0,021 mL min⁻¹, permanecendo no estado estacionário por 168 h. Mesmo após o aumento da vazão para 0,025 mL min⁻¹ (342 h), percebe-se que a concentração de ésteres etílicos permaneceu praticamente

constante até 432 h de ensaio, quando começou a diminuir. Nesta vazão o estado estacionário teve duração de 72 h.

Na Figura 4.25b, verifica-se que a velocidade específica de formação de ésteres etílicos, calculada pela Equação 3.16, foi máxima de $0,086 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em 96 h com a vazão de $0,021 \text{ mL min}^{-1}$ e no estado estacionário a velocidade específica média foi de $0,07 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Após o aumento da vazão, a velocidade específica de formação de ésteres etílicos também aumentou, alcançando um valor de $0,09 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ no estado estacionário. Este valor foi semelhante ao obtido durante o estado estacionário do Experimento 8, realizado na presença de solvente e na mesma vazão ($0,025 \text{ mL min}^{-1}$), indicando ser esta a vazão que proporcionou maiores velocidades específicas de formação de ésteres etílicos, tanto na presença quanto na ausência do solvente terc-butanol, quando se utilizou a lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em suporte híbrido polissiloxano - álcool polivinílico (AK SiO₂-PVA).

O rendimento do Experimento 9 foi superior a $0,50 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{ésteres etílicos teórica}}^{-1}$ após 96 h de ensaio, como mostra a Figura 4.26, ficando 23% abaixo do rendimento obtido no ensaio na presença de solvente (Experimento 8).

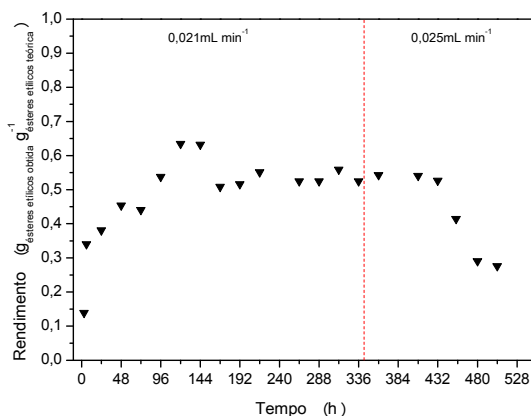


Figura 4.26 Experimento 9 – Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, ausência de solvente, vazão 0,021 e 0,025 mL min⁻¹, tempo espacial de 5,5 e 4,4 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA.

A Tabela 4.2 apresenta os dados de concentração, velocidade específica de formação, produtividade e rendimento de ésteres etílicos do estado estacionário obtidos nos ensaios em reator tipo leito fixo utilizando a lipase AK SiO₂-PVA. Verifica-se que o solvente, terc-butanol, não teve influência na velocidade específica de formação dos ésteres etílicos e nem na concentração destes ésteres na vazão de 0,025 mL min⁻¹. No entanto, a presença do solvente propiciou um aumento no rendimento (Experimento 8) quando comparado ao ensaio livre de solvente (Experimento 9), causada pela diluição dos substratos na entrada do reator que ocorre pela adição do solvente no meio reacional. Não se tem idéia do erro embutido nos dados apresentados de produtividade, já que os ensaios não foram repetidos. Porém para fins de processo, não há muita variação da produtividade em ésteres etílicos em relação às vazões testadas.

Tabela 4.2 Concentração, velocidade específica de formação e rendimento dos ésteres etílicos no estado estacionário, obtidos nos ensaios realizados com a lipase AK SiO₂-PVA em reator tipo leito fixo.

Experimento	8	9
Solvente	Presença	Ausência
Vazão (mL min ⁻¹)	0,025	0,021 0,025
Concentração (g _{ésteres etílicos} g _{total} ⁻¹)	0,41	0,39 0,39
Velocidade específica de formação (g _{ésteres etílicos} g _{total} ⁻¹ h ⁻¹)	0,09	0,07 0,09
Rendimento (g _{ésteres etílicos obtida} g _{ésteres etílicos teórica} ⁻¹)	0,70	0,52 0,51
Produtividade (mg _{ésteres etílicos} g _{totais} ⁻¹ h ⁻¹)	95,38	70,62

Há uma queda de rendimento com o aumento da vazão, no Experimento 9, sendo que o início desta queda ocorreu após 72 h da mudança da vazão. Assim, esta não deve estar relacionada ao aumento da vazão e sim a perda de atividade da enzima. Foi descartada a hipótese de que o aumento da vazão retira a enzima fracamente ligada ao suporte, uma vez que não foi observada nenhuma mudança da coloração na corrente de saída do biorreator, já que a lipase AK SiO₂-PVA possui uma coloração escura característica.

Tongboriboon, Cheirsilp *et al.* (2010) estudaram a etanólise do óleo de palma utilizando uma mistura de lipases imobilizadas em Accurel EP-100 (Lipase AK de *Pseudomonas fluorescens* e Lipase AY de *Candida rugosa*) na ausência de solvente. Os autores atingiram rendimento máximo de ésteres etílicos de 67% em 8 h, que diminuiu para 59 e 49% após 12 h e 22 h, respectivamente. Segundo os autores, isto pode ser explicado pelo efeito de subproduto da etanólise, o glicerol. Em reatores do tipo leito fixo, o glicerol pode permanecer na parte inferior da coluna devido a sua maior viscosidade, além de perturbar a difusão de substratos para a molécula de lipase, diminuindo a eficiência da reação e aumentando gradualmente o álcool não reagido (Watanabe, Shimada *et al.*, 2000). O glicerol é hidrofílico e insolúvel em óleo, por isso é facilmente adsorvido na superfície da lipase imobilizada levando ao efeito negativo sobre a atividade da lipase e estabilidade operacional (Stevenson, Stanley *et al.*, 1994).

No Experimento 10 foi utilizado como catalisador a lipase comercial Novozym® 435 (2,50 g massa úmida), razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, ausência de solvente, temperatura de 50 °C, fluxo ascendente de alimentação do substrato a uma vazão de 0,016 mL min⁻¹ e reator com volume de 10,5 mL. Com a mudança do biocatalisador, decidiu-se trabalhar na menor vazão possível que a bomba peristáltica pudesse operar, a fim de observar o comportamento da nova enzima. Também foi alterada a configuração do tanque de mistura do substrato que alimentava o biorreator para tentar evitar a entrada de bolhas de ar no biorreator (Figura 4.27). O substrato era retirado com auxílio da bomba peristáltica da parte inferior do tanque, enquanto que nos ensaios anteriores era retirado da parte superior do tanque de mistura.

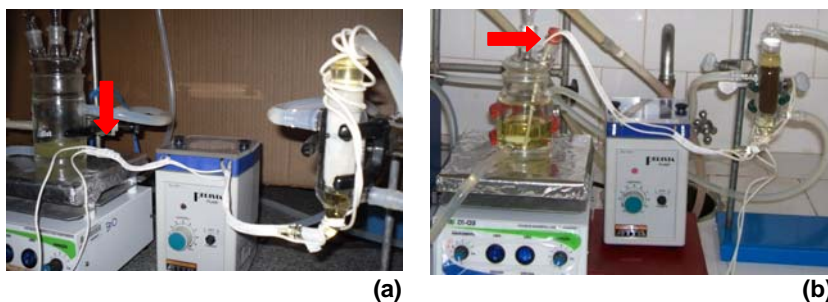


Figura 4.27 (a) Tanque de alimentação do substrato com saída inferior

(b) Tanque de alimentação do substrato com saída superior.

A Figura 4.28 apresenta o comportamento dinâmico da concentração de ésteres etílicos e da velocidade específica de formação destes ésteres para o Experimento 10 que teve a duração de 648 h.

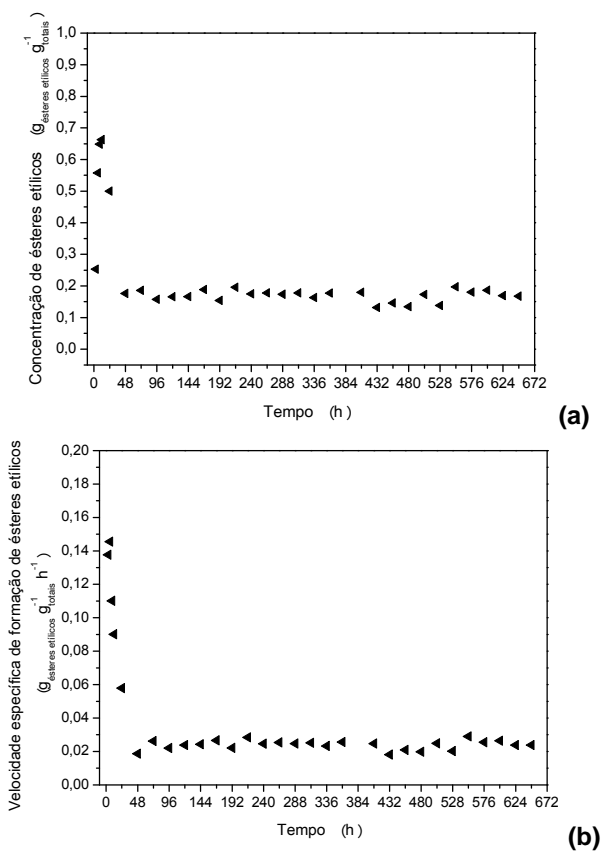


Figura 4.28 Experimento 10 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanólise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, ausência de solvente, vazão 0,016 mL min⁻¹, tempo espacial 7,0 h) empregando-se a lipase Novozym® 435 (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.

Pela Figura 4.28a verifica-se que em 12 h de ensaio foi alcançada a concentração máxima de ésteres etílicos ($0,66 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1}$) e em 48 h foi atingido o estado estacionário que permaneceu até o final do ensaio, com uma concentração média de $0,17 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1}$. A Figura 4.28b mostra que a velocidade específica de formação de ésteres etílicos, calculada pela Equação 3.16, foi máxima de $0,14 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em 6 h, e no estado estacionário a velocidade específica média foi de $0,02 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ g}_{\text{total}}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

O Experimento 10, apesar de ter atingido o estado estacionário e este permanecer até o final do ensaio sem ser observada nenhuma queda, tanto na concentração quanto na velocidade específica de formação dos ésteres etílicos, teve grandes problemas operacionais, principalmente de formação de bolhas de ar como mostra a Figura 4.29.

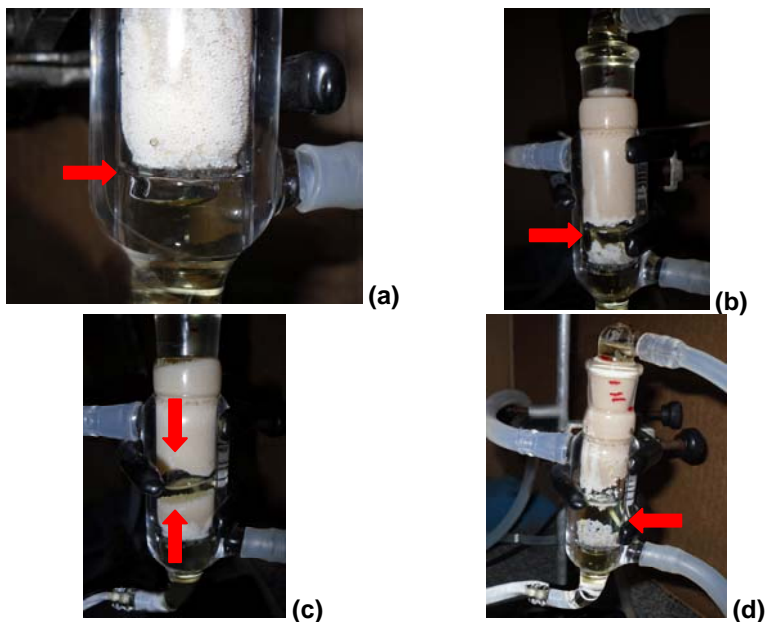


Figura 4.29 Experimento 10 – (a) Bolha de ar na parte inferior do reator de leito fixo. (b) Bolha de ar levantando o leito de enzima. (c) Bolha de ar dividindo o leito de enzima em duas partes. (d) Bolha de ar levantando o leito de enzima por inteiro.

No entanto, verifica-se pela consistência dos resultados, não ter sido este o motivo do baixo rendimento obtido (Figura 4.30), que no estado estacionário foi de $0,23 \text{ g}_{\text{ésteres etílicos obtida}} \text{ g}_{\text{ésteres etílicos teórica}}^{-1}$. Apesar da lipase Novozym® 435 ter alta estabilidade, a sua atividade é diminuída ao entrar em contato com o sistema de reação utilizado. Supõe-se que os baixos valores obtidos de rendimento estejam relacionados com as condições utilizadas, que não foram adequadas para esta lipase.

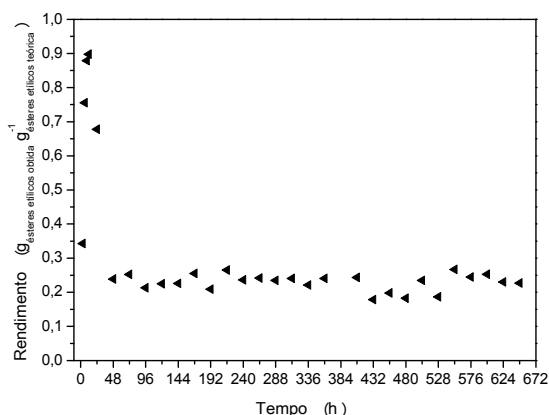


Figura 4.30 Experimento 10 – Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, razão molar etanol:óleo 9:1, ausência de solvente, vazão $0,016 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial 7,0 h) empregando-se a lipase Novozym® 435.

Segundo Severac, Galy *et al.* (2011), para desenvolver um processo economicamente viável, a estabilidade operacional da enzima tem que permanecer elevada durante várias semanas ou mesmo vários meses, sem perda significativa de atividade. A literatura reporta que, em sistemas com ausência de solvente, o reator de leito fixo pode ser operado de 3 a 7 dias sem redução do rendimento de éster (Chang, Chen *et al.*, 2009; Ognjanovic, Bezbradica *et al.*, 2009). Neste trabalho foi possível operar o reator de leito fixo na ausência de solvente por 11 dias utilizando a lipase AK SiO₂-PVA (Experimento 9) e por 25 dias com a lipase Novozym® 435 (Experimento 10), sem queda no rendimento.

Para verificar o comportamento da lipase Novozym® 435 na presença do solvente terc-butanol, realizou-se o Experimento 11, utilizando como catalisador a lipase comercial Novozym® 435 (2,52 g massa úmida), razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, presença do solvente terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, temperatura de 50 °C, fluxo ascendente de alimentação do substrato a uma vazão de 0,018 mL min⁻¹ e reator com um volume de 10,5 mL.

A Figura 4.31 apresenta o comportamento dinâmico da concentração de ésteres etílicos e da velocidade específica de formação destes ésteres, calculada pela Equação 3.16, para o Experimento 11 que também teve a duração de 648 h.

Foi observado um comportamento diferente ao do Experimento 10 quando foi utilizado solvente com a lipase Novozym® 435; não houve um pico de concentração inicial, ou seja, a concentração no Experimento 11 foi máxima de 0,40 g_{ésteres etílicos} g_{total}⁻¹ em 42 h de ensaio. O estado estacionário foi atingido a partir de 168 h e, durante este, a concentração média de ésteres etílicos foi de 0,36 g_{ésteres etílicos} g_{total}⁻¹. A Figura 4.31b mostra que a velocidade específica máxima do Experimento 11 foi de 0,07 g_{ésteres etílicos} g_{total}⁻¹ h⁻¹ em 12 h e que no estado estacionário a velocidade específica média de formação de ésteres etílicos foi de 0,06 g_{ésteres etílicos} g_{total}⁻¹ h⁻¹.

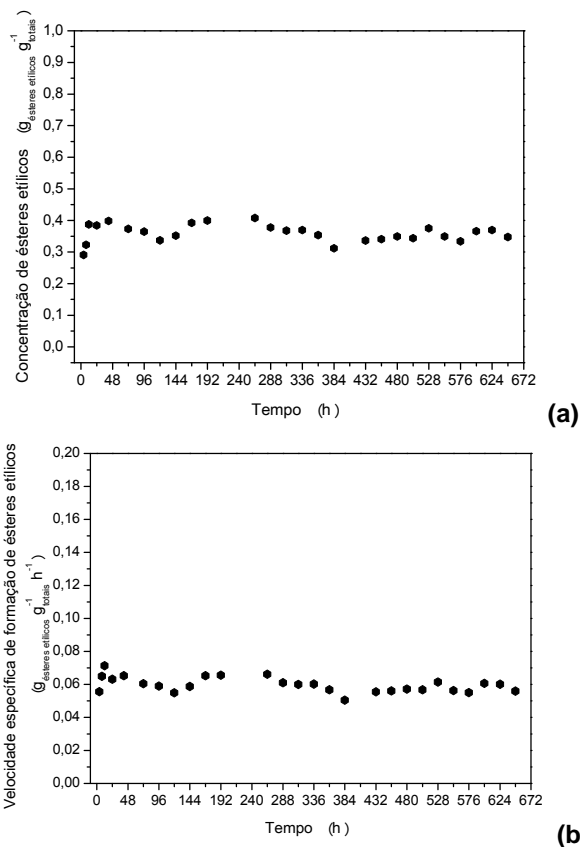


Figura 4.31 Experimento 11 - (a) Concentração de ésteres etílicos obtida da reação de etanólise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, adição de terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão 0,018 mL min⁻¹, tempo espacial 6,1 h) empregando-se a lipase Novozym® 435 (b) Velocidade específica de formação dos ésteres etílicos.

Um rendimento bem superior ao obtido no ensaio com ausência de solvente foi alcançado no Experimento 11, conforme mostra a Figura 4.32. O rendimento médio durante o estado estacionário foi de 0,57 $\frac{\text{g}_{\text{ésteres etílicos obtida}}}{\text{g}_{\text{ésteres etílicos teórica}}^{-1}}$.

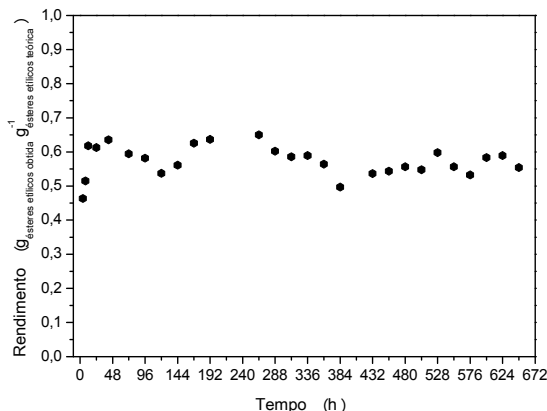


Figura 4.32 Experimento 11 – Rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, adição de terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão 0,018 mL min⁻¹, tempo espacial 6,1 h) empregando-se a lipase Novozym® 435.

A Tabela 4.3 apresenta os dados de concentração, velocidade específica de formação e rendimento de ésteres etílicos do estado estacionário obtidos nos ensaios em reator tipo leito fixo, utilizando a lipase Novozym® 435.

Tabela 4.3 Concentração, velocidade específica de formação e rendimento dos ésteres etílicos no estado estacionário, obtidos nos ensaios realizados com a lipase Novozym® 435 em reator tipo leito fixo.

Experimento	10	11
Solvente	Ausência	Presença
Vazão (mL min ⁻¹)	0,016	0,018
Concentração ($g_{\text{ésteres etílicos}} g_{\text{total}}^{-1}$)	0,17	0,36
Velocidade específica de formação ($g_{\text{ésteres etílicos}} g_{\text{total}}^{-1} h^{-1}$)	0,02	0,06
Rendimento ($g_{\text{ésteres etílicos obtida}} g_{\text{ésteres etílicos teórica}}^{-1}$)	0,23	0,57

Observa-se que o solvente terc-butanol teve grande influência na produção de ésteres etílicos quando se utilizou a lipase

Novozym® 435, uma vez que o rendimento na ausência de solvente, Experimento 10, foi bem inferior. Da mesma forma como ocorreu nos ensaios com a lipase AK SiO₂-PVA, (Experimentos 8 e 9), no entanto não com a mesma intensidade do que quando se utilizou a lipase Novozym® 435.

4.4 EFEITO DO SOLVENTE

Álcoois superiores (C2-C5) são normalmente considerados como solventes ou cosolventes em sínteses enzimáticas (Hansen, Waagen *et al.*, 1995; Chen, Xu *et al.*, 2004).

Neste trabalho, o terc-butanol foi utilizado como solvente e, conforme os resultados apresentados nos itens 4.2 e 4.3, nos ensaios realizados na presença do solvente os rendimentos foram superiores, para ambas as enzimas e reatores testados. Porém, pelo terc-butanol ser um álcool, existe a possibilidade de participar da reação como reagente formando éster butílico. Verificou-se que nos cromatogramas dos Experimentos 4 e 11, Figuras 4.33 e 4.34, novos picos surgiram em todas as amostras analisadas. Não foi possível realizar a identificação destes picos devido ao fato de não se ter os padrões cromatográficos apropriados.

A fim de verificar a possibilidade do terc-butanol estar agindo como aceptor de grupos acil, realizou-se um ensaio em batelada utilizando o terc-butanol como álcool na reação de alcoólise do óleo de palma catalisado pela lipase Novozym® 435. As condições utilizadas foram: razão molar terc-butanol:óleo de palma de 9:1, temperatura de 50 °C, 5% (m/m) de lipase em relação a massa total de substrato. A reação foi realizada em *shaker* e teve duração de 24 h. Após análise cromatográfica verificou-se que o tempo de retenção do maior pico (18,6 - 18,7 min) (Figura 4.35) era o mesmo tempo de retenção dos picos que apareceram nos cromatogramas dos Experimentos 4 e 11, Figuras 4.33 e 4.34. Assim, este pico é produto da reação com terc-butanol, uma vez que ele não aparece nos cromatogramas dos ensaios realizados na ausência de solvente (ver Apêndice C – a).

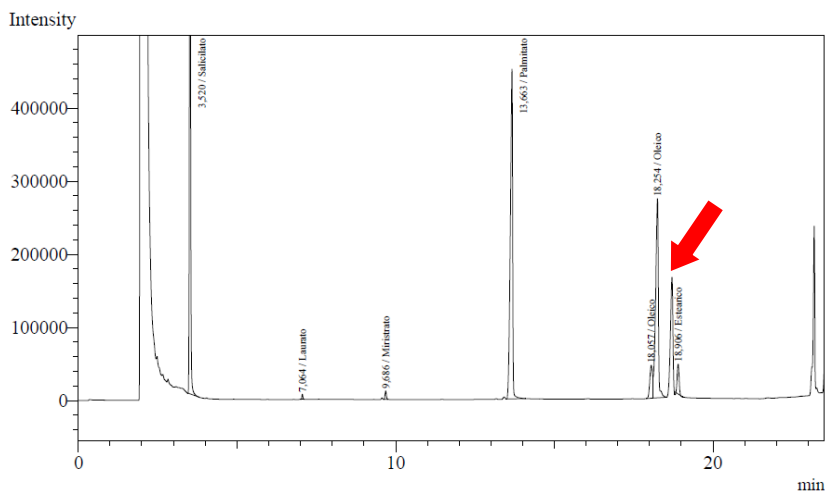


Figura 4.33 Experimento 4 – Cromatograma da amostra de 240 h de reação. Etanólise enzimática do óleo de palma em modo contínuo em reator tipo tanque agitado com cesta (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo, tempo espacial 13,1 h) empregando-se a lipase Novozym® 435.

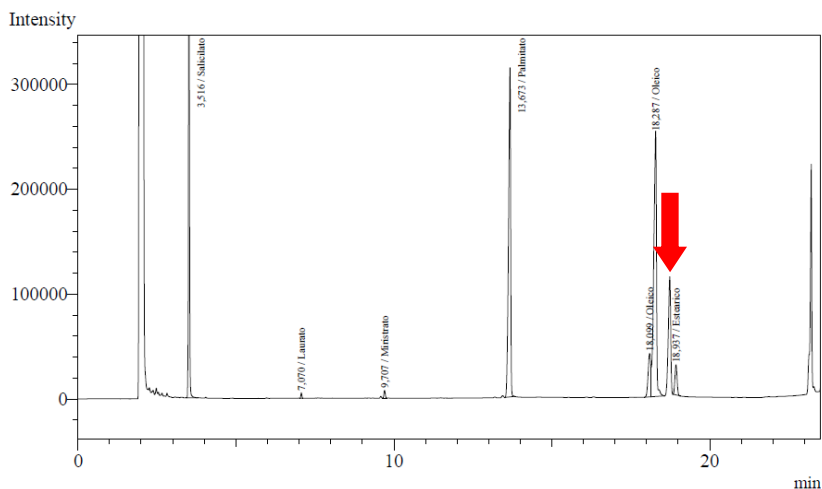


Figura 4.34 Experimento 11 – Cromatograma da amostra de 240 h de reação. Etanólise enzimática do óleo de palma em modo contínuo em reator tipo leito fixo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo, tempo espacial 6,1 h) empregando-se a lipase Novozym® 435.

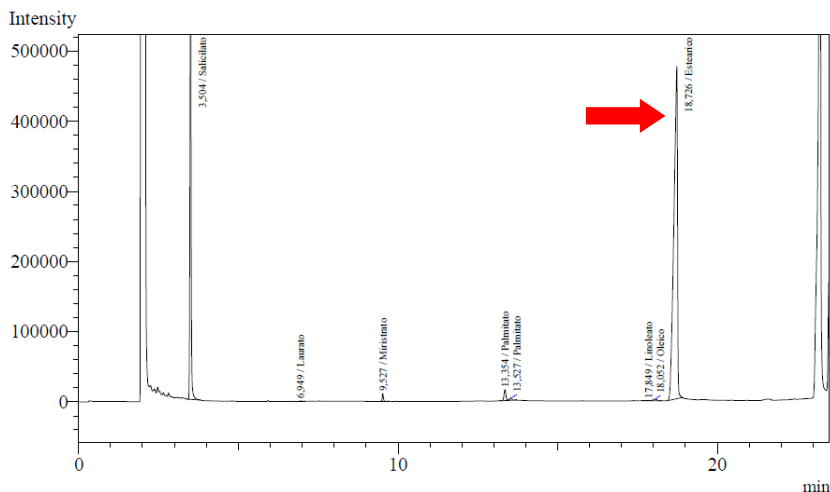


Figura 4.35 Experimento batelada com terc-butanol – Cromatograma da amostra de 24 h de reação. Etanolise enzimática do óleo de palma em reator tipo tanque agitado em modo batelada (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, 5% (m/m) de lipase em relação a massa total de substrato; reação realizada em *shaker* com duração de 24 h) empregando-se a lipase Novozym® 435.

No estudo publicado por Fu e Vasudevam (2009) foi confirmado que terc-butanol é um acceptor de grupos acil. No entanto, nenhum éster terc-butil foi detectado com concentrações inferiores a 10% (v/v) de terc-butanol. Os autores concluíram que a produção total de biodiesel, ou seja, ésteres metílicos mais os ésteres formados pelos álcoois pode ser reforçada se álcoois superiores são utilizados como cosolvente.

Em outro estudo publicado por Fu e Vasudevam (2009; 2010), os autores estudaram a mistura de solventes na metanolise do óleo de canola utilizando a lipase de *Candida antarctica* para minimizar e melhorar a desativação da enzima e a miscibilidade dos substratos. Iso-octano foi selecionado como o solvente hidrofóbico e seis cosolventes hidrofílicos foram misturados com iso-octano em diferentes proporções. No caso da mistura iso-octano e terc-butanol, o rendimento de biodiesel com 1% de terc-butanol foi maior do que o rendimento obtido com iso-octano puro. No entanto, acima de 5% de terc-butanol, a produção de biodiesel diminuiu com o aumento da concentração

de terc-butanol, indicando que a enzima foi inibida em altas concentrações de terc-butanol.

Mesmo obtendo rendimentos de biodiesel satisfatórios, nos ensaios realizados na presença de solvente, mais estudos devem ser realizados para fixar a quantidade de solvente, uma vez que quantidades como as usadas neste trabalho (30% em relação à massa de óleo de palma) podem ser consideradas excessivas em relação à inibição da enzima. Porém, outros aspectos também devem ser observados, como a miscibilidade do meio reacional e a retirada do glicerol da superfície da enzima que também podem inibir a reação enzimática.

4.5 PRODUTIVIDADE EM ÉSTERES ETÍLICOS

A Figura 4.36 apresenta o comportamento da produtividade de ésteres etílicos dos ensaios realizados com a lipase AK SiO₂-PVA em reator tipo leito fixo. Esta produtividade corresponde à velocidade de produção de ésteres etílicos quando não há acúmulo destes no reator (estado estacionário). Observa-se que na presença de solvente a produtividade foi maior (Experimento 7 e 8) do que no ensaio na ausência do solvente. A Figura 4.36b mostra os valores da produtividade no estado estacionário para cada vazão testada. No caso do Experimento 7 não foi possível verificar com certeza a formação do estado estacionário quando foi utilizada a vazão de 0,025 mL min⁻¹, considerou-se a tendência de formação entre os tempos de 312 a 335 h de ensaio. Assim sendo, a vazão que proporcionou maior produtividade foi a de 0,025 mL min⁻¹, tanto para os ensaios realizados na presença quanto na ausência de solvente.

Na Figura 4.37, estão apresentados os valores de produtividade dos ésteres etílicos dos ensaios realizados com a lipase Novozym® 435 nos dois tipos de reatores utilizados: tanque agitado com cesta e leito fixo. O reator tipo leito fixo apresentou maiores produtividades de ésteres etílicos na presença de solvente quando comparado ao reator tipo tanque agitado com cesta. Por outro lado, na ausência de solvente, os valores de produtividade foram semelhantes aos obtidos quando se utilizou o reator tipo tanque agitado com cesta. A Figura 4.37b mostra o comportamento da produtividade dos ésteres etílicos no estado estacionário, evidenciando, mais uma vez, a elevada

produtividade do reator tipo leito fixo na presença do solvente. No caso do reator tipo tanque agitado com cesta, verificou-se que a presença do solvente não interferiu na produtividade dos ésteres etílicos.

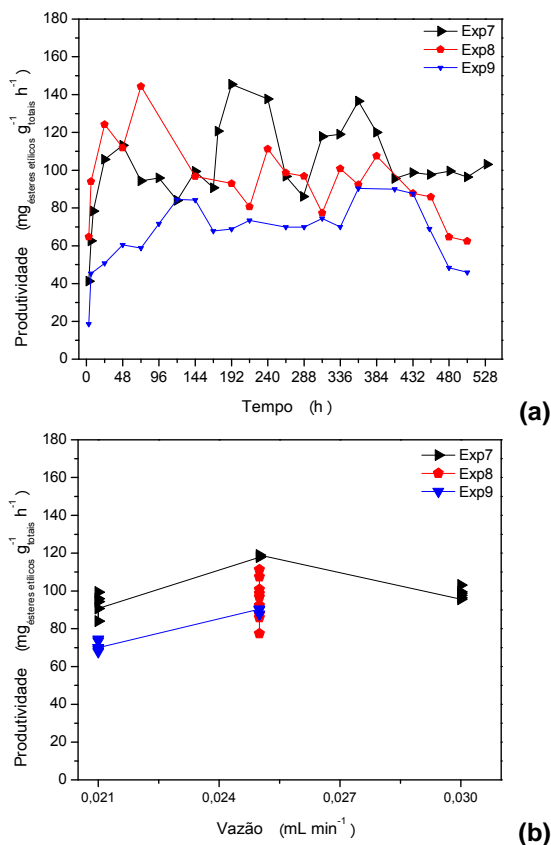


Figura 4.36 (a) Produtividade de ésteres etílicos dos ensaios realizados com a lipase AK SiO₂-PVA. (b) Comportamento da produtividade de ésteres etílicos em função da vazão no estado estacionário. Condições reacionais: razão molar etanol:óleo de palma de 9:1, 50 °C, reator tipo leito fixo operando em modo contínuo utilizando a lipase AK SiO₂-PVA. Exp 7: presença de solvente com variação da vazão de 0,021, 0,025 e 0,030 mL min^{-1} , Exp 8: presença de solvente utilizando a vazão de 0,025 mL min^{-1} e Exp 9: ausência de solvente com variação da vazão 0,021 e 0,025 mL min^{-1} .

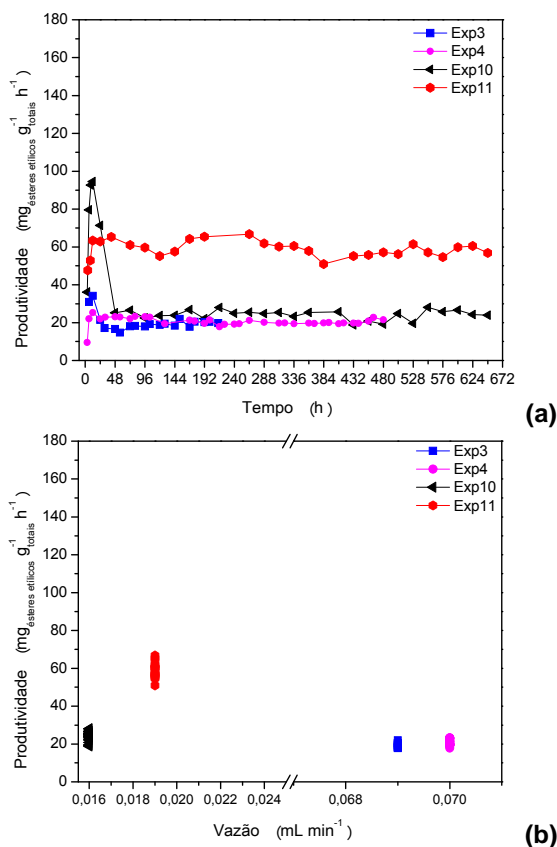


Figura 4.37 (a) Produtividade de ésteres etílicos dos ensaios realizados com a lipase Novozym® 435. (b) Comportamento da produtividade de ésteres etílicos em função da vazão no estado estacionário. Condições reacionais: razão molar etanol:óleo de 9:1, 50 °C utilizando a lipase Novozym® 435. Exp 3: reator tipo tanque agitado com cesta, ausência de solvente utilizando a vazão de 0,069 $mL min^{-1}$ e Exp 4: reator tipo tanque agitado com cesta, presença de solvente utilizando a vazão de 0,070 $mL min^{-1}$. Exp 10: reator tipo leito fixo, ausência de solvente utilizando a vazão de 0,016 $mL min^{-1}$, Exp 11: reator tipo leito fixo, presença de solvente utilizando a vazão de 0,018 $mL min^{-1}$.

Nas condições reacionais utilizadas neste trabalho, verificou-se que a lipase AK SiO₂-PVA apresentou maiores produtividades em ésteres etílicos quando se utilizou o reator tipo

leito fixo na ausência ou presença de solvente, quando comparada aos ensaios com a lipase Novozym® 435.

4.6 VISCOSIDADE DO PRODUTO

A viscosidade pode ser usada como um parâmetro para o controle da produção de biodiesel. A diferença entre a viscosidade da matéria-prima e do biodiesel pode ser usada para confirmar a conversão dos óleos vegetais ou gorduras animais em ésteres (De Filippis, Giavarini *et al.*, 1995). A viscosidade é um dos fatores mais importantes no que diz respeito ao funcionamento correto de motores diesel. A viscosidade aumenta com o comprimento da cadeia (número de átomos de carbono) e com a saturação, e essa característica também é válida para os álcoois; ou seja, quanto maior a cadeia do álcool utilizado na reação, maior a viscosidade do produto. Logo, ésteres etílicos são mais viscosos que ésteres metílicos (Knothe, 2005).

A Figura 4.38 apresenta o comportamento da viscosidade absoluta dos ensaios realizados em relação ao rendimento obtido nos ensaios e a viscosidade absoluta do óleo de palma.

A viscosidade absoluta das amostras purificadas de biodiesel apresentou uma redução com o aumento do rendimento da reação e também em relação ao óleo de palma (29,5 cP). Pode-se dizer que a redução dos valores da viscosidade das amostras confirma a conversão do óleo vegetal em ésteres etílicos. Os ensaios realizados com a lipase Novozym® 435 na presença de solvente proporcionaram maiores reduções da viscosidade comparada aos ensaios na ausência de solvente, para ambos os reatores testados.

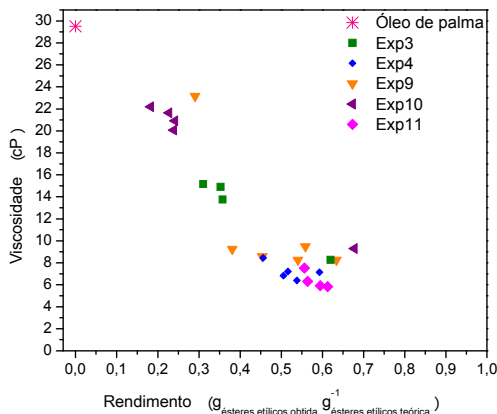


Figura 4.38 Viscosidade absoluta versus rendimento da reação de etanolise enzimática do óleo de palma em modo contínuo (razão molar 9:1 etanol:óleo, 50 °C). Reações realizadas em reator tipo tanque agitado com cesta com a lipase Novozym® 435: Exp 3: ausência de solvente e Exp 4: presença de solvente. Reações realizadas em reator tipo leito fixo: Exp 9: ausência de solvente, AK SiO₂-PVA; Exp 10: ausência de solvente, Novozym® 435; Exp 11: presença de solvente, Novozym® 435.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 4.38, para valores de rendimento abaixo de $0,6 \frac{\text{g ésteres etílicos obtida}}{\text{g ésteres etílicos teórica}}^{-1}$ estes rendimentos podem ser relacionados com a viscosidade de forma linear, indicando que a viscosidade pode ser usada para avaliar o rendimento da reação. Para rendimentos superiores a $0,6 \frac{\text{g ésteres etílicos obtida}}{\text{g ésteres etílicos teórica}}^{-1}$ não é possível estabelecer uma relação com a viscosidade.

4.7 COMPORTAMENTO DAS LIPASES

Foram realizadas medidas de atividade enzimática antes do início e ao final dos experimentos. A Tabela 4.4 apresenta os valores de atividade enzimática obtidos.

Foram utilizadas diferentes metodologias na determinação da atividade enzimática das lipases: hidrólise do azeite de oliva para a lipase AK SiO₂-PVA e hidrólise do butirato de metila para a lipase Novozym® 435. Mediante ensaios realizados foi

identificado que a lipase Novozym® 435 apresenta uma baixa atividade hidrolítica quando se utiliza o azeite de oliva como substrato.

Tabela 4.4 Atividade das lipases antes do início e no final dos experimentos.

Experimento	Enzima	Solvente	AE _{inicial} (U g _{catalisador} ⁻¹)	AE _{final} (U g _{catalisador} ⁻¹)
<i>Reator tipo tanque agitado com cesta</i>				
1	Novozym® 435	Ausência	nd	nd
2	Novozym® 435	Ausência	nd	nd
3	Novozym® 435	Ausência	1194,41	245,33
4	Novozym® 435	Presença	1335,33	531,54
<i>Reator tipo leito fixo</i>				
5	Novozym® 435	Ausência	nd	nd
6	AK SiO ₂ -PVA	Ausência	2180,15	nd
7	AK SiO ₂ -PVA	Presença	1992,39	1539,82
8	AK SiO ₂ -PVA	Presença	2560,73	1337,47
9	AK SiO ₂ -PVA	Ausência	2125,54	962,46
10	Novozym® 435	Ausência	1711,25	85,06
11	Novozym® 435	Presença	1194,41	311,11

nd = não determinado, AE = atividade enzimática.

Mediante os valores de atividade enzimática apresentados na Tabela 4.4, percebe-se que a presença do solvente no meio reacional reduz a perda de atividade das enzimas em relação ao meio com ausência de solvente. O solvente utilizado foi muito melhor para a lipase AK SiO₂-PVA do que para a Novozym® 435, nas condições reacionais utilizadas. Para a lipase Novozym® 435, o valor da atividade enzimática final é o mesmo durante todo o estado estacionário, que é alcançado rapidamente. A lipase Novozym® 435 não está perdendo atividade com o tempo, mas há uma perda de atividade muito rapidamente quando ela entra em contato com o meio reacional.

Esta perda de atividade pode estar relacionada com a inibição da enzima devido ao etanol, uma vez que a presença do solvente aumenta a atividade da enzima. De qualquer forma, não há acúmulo de glicerol na superfície do catalisador, pois o estado estacionário é alcançado e se mantém. Por outro lado, para a lipase AK SiO₂-PVA também percebeu-se uma perda de atividade enzimática, porém com menor intensidade quando comparada com a lipase Novozym® 435.

Apesar da lipase Novozym® 435 ter alta estabilidade, a sua atividade foi diminuída quando em contato com substrato livre de solvente. No entanto, em termos operacionais, ela foi muito mais estável que a lipase AK SiO₂-PVA.

Mesmo não tendo sido avaliada atividade enzimática no Experimento 5, foi possível observar a mudança na superfície da lipase Novozym® 435 com auxílio da Microscopia de Eletrônica de Varredura (MEV), como mostra a Figura 4.39, da mesma forma como ocorreu com a lipase AK SiO₂-PVA no Experimento 4 (Figura 4.16).

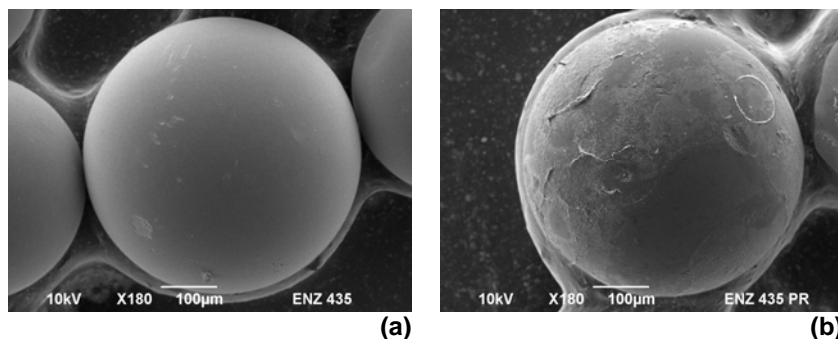


Figura 4.39 Experimento 5 - MEV (a) Biocatalisador original antes da reação e (b) biocatalisador após a reação. Etanolise enzimática do óleo de palma em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 6:1, tempo espacial 9,6 h, adição de Triton X-100 10% (m/v) em relação ao substrato em 194 h de reação) empregando-se a lipase imobilizada Novozym® 435.

A Figura 4.40 apresenta a composição molar do óleo de palma e dos monoésteres de etila produzidos nos experimentos realizados com as lipases AK SiO₂-PVA e Novozym® 435. Sabe-se que o óleo de palma possui em sua composição o ácido

palmitico (C16) e o ácido oleico (C18:1), como ácidos graxos majoritários. Observa-se uma acentuada formação dos ésteres de palmitato de etila e oleato de etila, em todos os ensaios realizados.

Em relação aos ensaios realizados na ausência de solvente e em reator tipo leito fixo, tanto para a lipase AK SiO₂-PVA como para a Novozym® 435, percebe-se que houve maior formação do palmitato de etila (Experimento 9 e 10). Por outro lado, na presença de solvente, verificou-se que a lipase Novozym® 435 teve uma produção de palmitato de etila e oleato de etila bem parecida. No reator de leito fixo houve diferenças na produção dos monoésteres, enquanto que no reator tipo tanque agitado com cesta a produção dos monoésteres foi semelhante tanto na presença quanto na ausência de solvente utilizando a lipase Novozym® 435.

A ausência de solvente nos ensaios realizados com a lipase AK SiO₂-PVA dificulta a produção do monoéster derivado do ácido oléico (C18:1), enquanto que para a lipase Novozym® 435 a ausência de solvente não altera a proporção de formação dos monoésteres majoritários derivados dos ácidos palmítico e oleico (C16 e C18:1) quando comparado a composição do óleo de palma. De maneira geral, a proporção de C16 e C18:1 do óleo de palma se conserva no produto indicando que as enzimas não são específicas.

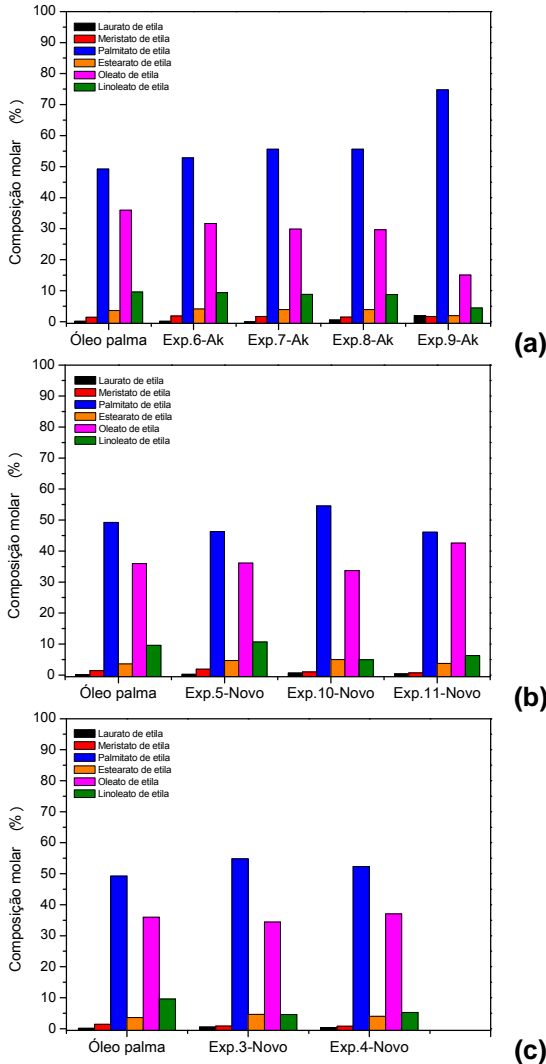


Figura 4.40 Composição molar dos monoésteres dos ensaios com a lipase (a) AK SiO₂-PVA em reator de leito fixo, Exp 6: presença de Triton; Exp 7 e 8: presença de solvente; Exp 9: ausência de solvente, (b) Novozym® 435 em reator de leito fixo. Exp 5 e 10: ausência de solvente; Exp 11: presença de solvente, (c) Novozym® 435 em reator tanque agitado com cesta Exp 3: ausência de solvente e Exp 4: presença de solvente. A composição molar do óleo é apresentada em termos de ácidos graxos correspondente aos ésteres da legenda.

4.8 ESTABILIDADE DAS LIPASES

Um parâmetro de fundamental importância, quando se trabalha com processos que envolvem enzimas imobilizadas, é a sua estabilidade operacional, que depende de uma série de fatores, tais como: desprendimento da enzima do suporte, obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários e perda de suporte por atrito e obstrução do leito fixo, causando caminhos preferenciais (Zanin e Moraes, 2004). Uma elevada estabilidade da lipase poderia tornar a alcoólise enzimática contínua atrativa para o uso industrial, principalmente devido ao elevado custo das lipases.

Todos os experimentos tiveram duração superior a 20 dias, exceto os Experimentos 3, 5 e 6. Nas Figuras apresentadas nos itens 4.2 e 4.3 percebem-se pequenas oscilações no decorrer dos ensaios, comuns em sistemas desta natureza.

O modelo de Sadana foi aplicado para todos os experimentos. No entanto, entre os ensaios realizados com a lipase AK SiO₂-PVA o único ensaio que se ajustou ao modelo foi o Experimento 8 (Figura 4.41). Nos ensaios realizados com a lipase Novozym® 435, a fase de estado estacionário teve longa duração e a atividade da enzima se manteve. Não foi observado decaimento da concentração de ésteres etílicos em nenhum dos ensaios realizados, portanto não foi possível aplicar o modelo de Sadana nestes experimentos.

A atividade residual cai desde o início do estado estacionário, seguindo o modelo proposto por Sadana. Os valores de atividade residual maiores que 1 são devido aos erros inerentes à medida experimental. Sob essas condições, o tempo de meia-vida de 12,3 dias e uma constante de desativação de Sadana de $4 \cdot 10^{-6} \text{ h}^{-2}$, foram estimados para a lipase AK SiO₂-PVA. Esses valores foram semelhantes aos relatados por Osório, Gusmao, *et al.* (2005), na qual um tempo de meia-vida de 17 dias e a constante desativação de Sadana de $6,08 \cdot 10^{-6} \text{ h}^{-2}$ foram estimados para Novozym® 435, na interesterificação de estearina de palma com óleo de soja em um reator de leito fluidizado contínuo.

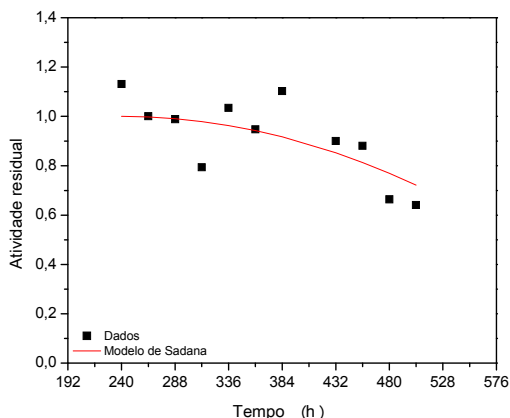


Figura 4.41 Atividade residual da enzima em função do tempo e ajuste ao Modelo de desativação de Sadana para a reação de etanólise enzimática do óleo de palma em reator tipo leito fixo em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar etanol:óleo 9:1, adição de terc-butanol na proporção 30% (v/v) em relação ao óleo de palma, vazão 0,025 mL min⁻¹, tempo espacial 4,6 h) empregando-se a lipase AK SiO₂-PVA.

4.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Tabela 4.5 apresenta um resumo dos ensaios realizados ao longo deste trabalho, informando as condições operacionais utilizadas e os resultados obtidos no estado estacionário de cada experimento. Constatam-se diferenças expressivas em função das propriedades morfológicas e catalíticas das lipases testadas.

Comparando os ensaios realizados com as duas enzimas no reator tipo leito fixo, verifica-se que valores semelhantes de concentração, velocidade específica de formação e rendimento de ésteres etílicos foram obtidos entre o Experimento 9, lipase AK SiO₂-PVA na ausência de solvente, e o Experimento 11, lipase Novozym® 435 na presença de solvente. Nas condições testadas, o ensaio que proporcionou os melhores resultados foi o Experimento 7 realizado com a lipase AK SiO₂-PVA na presença de solvente que alcançou rendimentos superiores a 80%, uma concentração de ésteres etílicos de 0,5 g_{ésteres etílicos} g_{total}⁻¹ e velocidade específica de formação de ésteres etílicos de 0,09 g_{ésteres etílicos} g_{total}⁻¹ h⁻¹.

Tabela 4.5 Resumo dos resultados obtidos nos ensaios realizados em reator tipo tanque agitado com cesta e reator tipo leito fixo.

Exp.	Lipase	Condições reacionais	Concentração ^a	Velocidade ^b	Rendimento ^c
<i>Reator tipo tanque agitado com cesta</i>					
1	Novozym® 435	RM = 6:1 T = 45 °C M _e = 2,00 g ^d	0,024	0,002	0,29
2	Novozym® 435	RM = 6:1 T = 45 °C M _e = 2,02 g ^d	0,05 ^f	0,007 ^f	0,06 ^f
3	Novozym® 435	RM = 9:1 T = 50 °C M _e = 2,51 g ^d	0,26	0,02	0,35
4	Novozym® 435	RM = 9:1 Terc-butanol = 30% v/v T = 50 °C M _e = 2,51 g ^d	0,27	0,02	0,48
<i>Reator tipo leito fixo</i>					
5	Novozym® 435	RM = 6:1 T = 50 °C M _e = 2,35 g ^e	^g	^g	^g
6	AK SiO ₂ -PVA	RM = 6:1 T = 50 °C Triton-X100 = 10% m/v M _e = 6,74 g ^e	0,11	0,02	0,16
7	AK SiO ₂ -PVA	RM = 9:1 Terc-butanol = 30% v/v T = 50 °C M _e = 6,70 g ^e	0,51 0,55 ^f 0,37	0,09 0,12 ^f 0,09	0,81 0,88 ^f 0,58
8	AK SiO ₂ -PVA	RM = 9:1 Terc-butanol = 30% v/v T = 50 °C M _e = 6,71 g ^e	0,41	0,09	0,70
9	AK SiO ₂ -PVA	RM = 9:1 T = 50 °C M _e = 6,70 g ^e	0,39 0,39	0,07 0,09	0,52 0,51
10	Novozym® 435	RM = 9:1 T = 50 °C M _e = 2,50 g ^d	0,17	0,02	0,23
11	Novozym® 435	RM = 9:1 Terc-butanol = 30% v/v T = 50 °C M _e = 2,52 g ^d	0,36	0,06	0,57

^a Concentração de ésteres etílicos no estado estacionário ($g_{\text{ésteres etílicos}} g_{\text{total}}^{-1}$), ^b Velocidade específica de formação de ésteres etílicos no estado estacionário ($g_{\text{ésteres etílicos}} g_{\text{total}}^{-1} h^{-1}$), ^c Rendimento de ésteres etílicos no estado estacionário ($g_{\text{ésteres etílicos}} g_{\text{teórica}}^{-1}$), ^d massa úmida, ^e massa seca, ^f suposição de estado estacionário, ^g estado estacionário não atingido

Diante desses resultados fica evidente que as condições reacionais para cada enzima devem ser otimizadas para cada configuração de reator proposto. Salienta-se que as condições utilizadas neste estudo foram mais favoráveis para a lipase AK SiO₂-PVA do que para a Novozym® 435. A otimização destas condições se faz necessária para que a Novozym® 435 possa mostrar seu real desempenho na produção de ésteres etílicos nos reatores propostos.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que é viável e promissora a produção de biodiesel via catálise enzimática. A continuidade de trabalhos nesta linha irá permitir a competitividade destes bioprocessos frente aos processos químicos atuais, colaborando para o desenvolvimento ambientalmente sustentável.

5. Conclusão

O objetivo principal deste trabalho foi estudar o comportamento da produção contínua de biodiesel via catálise enzimática do óleo de palma e etanol, utilizando as lipases AK SiO₂-PVA e Novozym® 435, na ausência e presença de solvente em reator tipo tanque agitado com cesta e leito fixo. Da análise e discussão dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A síntese do suporte híbrido SiO₂-PVA propiciou maior área superficial que o catalisador comercial (Novozym® 435), embora com diâmetro de poro menor.
- É possível obter biodiesel em biorreatores contínuos tipo tanque agitado com cesta, mesmo operando na ausência de solvente. O rendimento da etanolise foi baixo e é bastante dependente de detalhes de configuração do sistema e operação do reator. Apesar do baixo rendimento, o sistema mostrou-se robusto e estável, permanecendo no estado estacionário por longo período (400 h), mesmo após problemas na alimentação.
- A presença do solvente, nos ensaios com o reator tipo tanque agitado com cesta, não altera a velocidade específica de formação de ésteres etílicos e a concentração de ésteres etílicos, mas altera o rendimento da reação.
- Foi possível obter biodiesel em biorreator tipo leito fixo operando em modo contínuo, tanto na presença quanto na ausência de solvente. Para a operação do reator tipo leito fixo, o fluxo ascendente mostrou-se mais favorável operacionalmente.
- A presença de surfactante Triton X-100 na massa reagente evita o problema de separação de fases, porém promove uma redução acentuada na velocidade de formação dos ésteres etílicos, que está associada à dessorção da lipase do suporte SiO₂-PVA. O uso de Triton X-100 deve ser descartado.
- A presença do solvente terc-butanol na massa reagente evita a separação de fases e não tem influência na velocidade específica de formação dos ésteres etílicos e nem na concentração destes ésteres, nos ensaios

realizados com a lipase AK SiO₂-PVA. No entanto, a presença do solvente propiciou um aumento no rendimento de ésteres etílicos.

- O solvente terc-butanol tem grande influência na produção de ésteres etílicos quando se utiliza a lipase Novozym® 435 no reator tipo leito fixo, alterando a concentração, velocidade específica de formação e o rendimento destes ésteres.
- O álcool terc-butanol utilizado como solvente é também reagente da reação enzimática, atuando como doador de grupos acil.
- Para a lipase AK SiO₂-PVA, a vazão de alimentação do reator de leito fixo de 0,025 mL min⁻¹, correspondente a um tempo espacial de 4,6 h, foi a que proporcionou maiores produtividades em ésteres etílicos, tanto na presença quanto na ausência de solvente
- Para a lipase Novozym® 435, maiores produtividades em ésteres etílicos foram obtidas no reator tipo leito fixo na presença do solvente.
- Houve uma relação linear de redução da viscosidade do biodiesel purificado com o aumento do rendimento da reação de etanolise do óleo de palma até o valor de rendimento de 0,6 g ésteres etílicos obtida g ésteres etílicos teórica⁻¹.
- As condições reacionais utilizadas não foram favoráveis para a atividade das lipases testadas, sendo que a presença do solvente no meio reacional reduz esta perda de atividade. A enzima Novozym® 435 teve maior perda de atividade que a AK SiO₂-PVA. Apesar da diminuição da atividade ocasionada pelas condições reacionais, esta atividade se mantém constante por longo período de estado estacionário, indicando uma estabilidade operacional, especialmente para a Novozym® 435.

6. Sugestão para trabalhos futuros

A lipase AK SiO₂-PVA mostrou-se muito interessante para o uso na etanolise do óleo de palma na ausência de solvente, que é um detalhe bastante atraente do ponto de vista operacional. Sugere-se a melhoria operacional dos reatores na ausência de solvente.

A lipase Novozym® 435 mostrou uma estabilidade muito expressiva para aplicação em processo contínuo, porém uma dependência em relação ao solvente. Assim, estudos devem ser realizados no intuito de redução das quantidades de solvente.

Estudos fenomenológicos sobre a inibição, causada pelo glicerol e álcoois utilizados sobre as enzimas, podem ajudar no melhoramento das condições de reação e operação do biorreator.

A modificação da cesta utilizada no reator do tipo tanque agitado, conforme a sugestão apresentada no trabalho de Baltaru, Galaction *et al.* (2009), impelidor com cesta, pode melhorar o contato entre a enzima e o meio reacional neste tipo de reator.

7. Referências Bibliográficas

ABIGOR, R. D.; UADIA, P. O.; FOGLIA, T. A.; HAAS, M. J.; JONES, K. C.; OKPEFA, E.; OBIBUZOR, J. U.; BAFOR, M. E. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, p. 979-981, 2000. ISSN 0300-5127.

AGROPALMA. **Ficha técnica de produto - Óleo de palma refinado**, 2007.

AIRES-BARROS, M. R. Biocatálise em solventes orgânicos. **Boletim de Biotecnologia**, v. 72, p. 2-13, 2002.

AKOH, C. C.; CHANG, S. W.; LEE, G. C.; SHAW, J. F. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8995-9005, 2007. ISSN 0021-8561.

AL-ZUHAIR, S.; LING, F. W.; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 951-960, 2007. ISSN 1359-5113.

ALLEN, C. A. W.; WATTS, K. C.; ACKMAN, R. G.; PEGG, M. J. Predicting the viscosity of biodiesel fuels from their fatty acid ester composition. **Fuel**, v. 78, n. 11, p. 1319-1326, 1999. ISSN 0016-2361.

AMANO. **Ficha de informação do produto - Lipase AK "Amano"**, 2008.

ANDREWES, P.; BALDWIN, A.; BROOME, A.; HILL, B.; HOLLAND, R.; MILLS, O.; NEWSTEAD, D. Detection of lipase in skim and whole milk powders using triheptanoin as a substrate. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 6, p. 587-595, 2007. ISSN 0958-6946.

ANEEL. **Atlas de energia elétrica do Brasil - Agência Nacional de Energia Elétrica**. 3 ed. Brasília: Aneel, 2008. ISBN: 978-85-

87491-10-7.

ANP. BIODIESEL. 2010a. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/?id=472> >. Acesso em: 26/12/2010.

_____. **Boletim mensal de Biodiesel**. Brasília: 9 p. 2010b.

_____. **Produção Nacional de Biodiesel Puro - B100**. Brasília 2010c.

_____. **Resolução ANP Nº 4, de 2.2.2010 - DOU 3.2.2010 - Retificada DOU 22.2.2010**. Brasília 2010d.

ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009. ISSN 0960-1481.

ANTCZAK, T.; PATURA, J.; SZCZESNA-ANTCZAK, M.; HILER, D.; BIELECKI, S. Sugar ester synthesis by a mycelium-bound *Mucor circinelloides* lipase in a micro-reactor equipped with water activity sensor. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 29, n. 1-6, p. 155-161, 2004. ISSN 1381-1177.

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas: Fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars Pharmaceutica**, v. 39, n. 2, p. 23-39, 1998. ISSN 0004-2927.

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 9-14, 2010. ISSN 1381-1177.

BALCAO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996. ISSN 0141-0229.

BALTARU, R.; GALACTION, A. I.; CASCAVAL, D. **Bioreactors of Basket Type with Immobilized Biocatalysts**. 2nd WSEAS INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOMEDICAL ELECTRONICS AND BIOMEDICAL INFORMATICS. Russia,

2009.

BARON, G. V.; WILLAERT, R. G.; BACKER, L. Immobilized cell reactors. In: WILLAERT, R.; BARON, G. V.; BACKER, L. **Immobilized living cell systems: Modeling and experimental Methods**. John Wiley & Sons, 1996, p.67-95.

BARROS, A. E. L.; ALMEIDA, A. M. P.; CARVALHO, L. B.; AZEVEDO, W. M. Polysiloxane/PVA-glutaraldehyde hybrid composite as solid phase for immunodetections by ELISA. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 4, p. 459-463, 2002. ISSN 0100-879X.

BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISAN, J. M. Single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486-493, 1998. ISSN 0006-3592.

BHATTI, H. N.; HANIF, M. A.; QASIM, M.; REHMAN, A. U. Biodiesel production from waste tallow. **Fuel**, v. 87, n. 13-14, p. 2961-2966, 2008. ISSN 0016-2361.

BORNSCHEUER, U. T.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, S. H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 433-437, 2002. ISSN 0167-7799.

BOSLEY, J. A.; PEILOW, A. D. Immobilization of lipases on porous polypropylene: Reduction in esterification efficiency at low loading. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 74, n. 2, p. 107-111, 1997. ISSN 0003-021X.

BROCKMAN, H. L. General features of lypolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: B. BORGSTROM and H. L. BROCKMAN, Elsevier (eds.), **Lipases**. Amsterdam, 1984.

BROCKMAN, H. L.; MOMSEN, W. E.; TSUJITA, T. Lipid-lipid complexes - Properties and effects on lipase binding to surfaces.

Journal of the American Oil Chemists Society, v. 65, n. 6, p. 891-896, 1988. ISSN 0003-021X.

BRUNO, L. A.; DE LIMA, J. L.; MELO, E. H. D.; DE CASTRO, H. F. Ester synthesis catalyzed by *Mucor miehei* lipase, immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol particles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, p. 189-199, 2004. ISSN 0273-2289.

BRUNO, L. M.; COELHO, J. S.; MELO, E. H. M.; LIMA, J. L. Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 189-192, 2005. ISSN 0959-3993.

CABANA, H.; JONES, J. P.; AGATHOS, S. N. Utilization of Cross-Linked Laccase Aggregates in a Perfusion Basket Reactor for the Continuous Elimination of Endocrine-Disrupting Chemicals. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 6, p. 1582-1592, 2009. ISSN 0006-3592.

CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUISAN, J. M. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p. 171-176, 2009. ISSN 1381-1177.

CARRAMENHA, F. **Estudo da viabilidade técnica e econômica da produção de biodiesel em escala industrial no Brasil**. 2007. 386 (Mestrado). Processos Industriais, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, São Paulo.

CASTIGLIONI, G. L. **Estudo da produção e utilização de lipase *Burkholderia cepacia* na síntese enzimática do biodiesel: produção de biodiesel via enzimática**. 2009. 180 (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CAZACU, M.; DRAGAN, S.; VLAD, A. Organic-inorganic polymer hybrids and porous materials obtained on their basis. **Journal of**

Applied Polymer Science, v. 88, n. 8, p. 2060-2067, 2003. ISSN 1097-4628.

CHANG, C.; CHEN, J. H.; CHANG, C. M. J.; WU, T. T.; SHIEH, C. J. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by isopropanolysis in a continuous packed-bed reactor using response surface methodology. **New Biotechnology**, v. 26, n. 3-4, p. 187-192, 2009. ISSN 1871-6784.

CHEN, H. C.; JU, H. Y.; WU, T. T.; LIU, Y. C.; LEE, C. C.; CHANG, C.; CHUNG, Y. L.; SHIEH, C. J. Continuous Production of Lipase-Catalyzed Biodiesel in a Packed-Bed Reactor: Optimization and Enzyme Reuse Study. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2011. ISSN 1110-7243.

CHEN, J. W.; WU, W. T. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 5, p. 466-469, 2003. ISSN 1389-1723.

CHEN, X.; DU, W.; LIU, D. H. Response surface optimization of biocatalytic biodiesel production with acid oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 423-429, 2008. ISSN 1369-703X.

CHEN, Y.; XU, J. H.; PAN, J.; XU, Y.; SHI, J. B. Catalytic resolution of (RS)-HMPC acetate by immobilized cells of *Acinetobacter* sp. CGMCC 0789 in a medium with organic cosolvent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 5-6, p. 203-208, 2004. ISSN 1381-1177.

CHEN, Y. M.; XIAO, B.; CHANG, J.; FU, Y.; LV, P. M.; WANG, X. W. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 3, p. 668-673, 2009. ISSN 0196-8904.

CHOWDARY, G. V.; PRAPULLA, S. G. The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 393-397, 2002. ISSN 0032-9592.

CHUNG, K. H.; KIM, J.; LEE, K. Y. Biodiesel production by transesterification of duck tallow with methanol on alkali catalysts. **Biomass & Bioenergy**, v. 33, n. 1, p. 155-158, 2009. ISSN 0961-9534.

CIFTCI, O. N.; FADILLOGLU, S.; GOGUS, F. Conversion of olive pomace oil to cocoa butter-like fat in a packed-bed enzyme reactor. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 324-329, 2009. ISSN 0960-8524.

COSTA, B. J.; DE OLIVEIRA, S. M. M. **Dossiê Técnico - Produção de biodiesel**. Instituto de Tecnologia do Paraná - Tecpar. 2006.

COSTA, L. R. **Biodiesel: estratégias para produção e uso no Brasil**. Relatório Técnico apresentado à Promon Engenharia, 2005.

COSTA NETO, P. R. **Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja**. 2002. 236 (Doutorado). Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L.; ZAGONEL, G.; RAMOS, L.P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, p. 531-537, 2000.

CRUZ JR., A. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B em quitosana para obtenção de biodiesel por transesterificação do óleo de mamona**. 2007. 107 (Mestrado). Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DA RÓS, P. C. M. **Etanolise de óleos vegetais por catálise enzimática acelerada por irradiação de micro-ondas**. 2009. 123 (Mestrado). Engenharia Química, Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: A Critical overview on the current status and perspectives at the academy and industry. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776-792,

2009. ISSN 0100-4042.

DALLA ROSA, C. **Produção enzimática de biodiesel em modo contínuo em meio pressurizado**. 2009. 136 (Doutorado). Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004. ISSN 0100-4042.

DE CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995. ISSN 0100-4042.

_____, MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modification of oils and fats by biotransformation. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004. ISSN 0100-4042.

_____, ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008, cap. 6. ISBN 978-85-7193-189-3.

DE FILIPPIS, P.; GIAVARINI, C.; SCARSELLA, M.; SORRENTINO, M. Transesterification processes for vegetable-oils - a simple control method of methyl-ester content. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 72, n. 11, p. 1399-1404, 1995. ISSN 0003-021X.

DEVANESAN, M. G.; VIRUTHAGIRI, T.; SUGUMAR, N. Transesterification of *Jatropha* oil using immobilized *Pseudomonas fluorescens*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2497-2501, 2007. ISSN 1684-5315.

Dendê. Disponível em: < <http://www.google.com.br/images> >. Acesso em: 11-2010.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D. Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.; KESKINLER, B. Biodiesel production from

sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 6, p. 1983-1991, 2009. ISSN 0960-8524.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3-5, p. 194-200, 1999. ISSN 0141-0229.

DU, W.; LIU, D.; LI, L.; DAI, L. Mechanism exploration during lipase-mediated methanolysis of renewable oils for biodiesel production in a tert-butanol system. **Biotechnology progress**, v. 23, n. 5, p. 1087-1090, 2007. ISSN 1520-6033.

____XU, Y. Y.; LIU, D. H. Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 38, p. 103-106, 2003. ISSN 0885-4513.

____XU, Y. Y.; LIU, D. H.; ZENG, J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 30, n. 3-4, p. 125-129, 2004. ISSN 1381-1177.

ERDMANN, H.; VORDERWERLBECKE, T.; SCHMID, R.; KIESLICH, K. In: ALBERGHING, L.; SCHMID, R. D.; VERGER, R. **Lipases: structure, mechanism and genetic engineering**. Braunschweig Germany: GBF Monographs, 1990, v. 16, p. 425-428.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry: A Textbook**. 3 ed. Berlin: Springer Verlag, 1997. ISBN 3540616888.

FADNAVIS, N. W.; SATYAVATHI, B.; SHEELU, G.; KALLAKUNTA, V.M.; NAMANI, T. **Porous vessel bioreactor**. US Patent 719894, 2007.

FELTES, M. M. C.; DORS, G.; SANTOS, A. F.; FURIGO JR., A.; NINOW, J. et al. Lipase-catalyzed synthesis of biodiesel via ethanolysis of chicken fat from processing by-products. **New Biotechnology**, v. 25, p. S277-S277, 2009. ISSN 1871-6784.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 242-250, 2007. ISSN 0006-3592.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298-1315, 2009. ISSN 0006-3592.

FOGLER, H. S. **Elements of chemical reaction engineering**. 3rd ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall PTR, 1999.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 769-777, 2007. ISSN 0141-0229.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. Transesterification kinetics of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 63, n. 10, p. 1375-1380, 1986. ISSN 0003-021X.

FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; MOUNTS, T. L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable-oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, n. 10, p. 1638-1643, 1984. ISSN 0003-021X.

FREITAS, L.; DA ROS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya* sp). **Process Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1068-1074, 2009. ISSN 1359-5113.

_____. PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of glyceride esters in solvent-free system: Influence of the molar ratio, lipase source and functional activating agent of the support. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 7, p. 1360-1366, 2007. ISSN 0103-5053.

_____. SANTOS, J. C.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Packed-Bed Reactor Running on Babassu Oil and Glycerol to Produce Monoglycerides by Enzymatic Route using Immobilized *Burkholderia cepacia* Lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 372-381, 2010. ISSN 0273-2289.

FU, B. **Effect of organic solvents and cosolvents on lipase-catalyzed transesterification of canola oil**. 2009. 131 (Master of Science). Chemical Engineering, University of New Hampshire, Durham.

FU, B. Y.; VASUDEVAN, P. T. Effect of Organic Solvents on Enzyme-Catalyzed Synthesis of Biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 8, p. 4105-4111, 2009. ISSN 0887-0624.

_____. Effect of Solvent-Co-solvent Mixtures on Lipase-Catalyzed Transesterification of Canola Oil. **Energy & Fuels**, v. 24, p. 4646-4651, 2010. ISSN 0887-0624.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001. ISSN 1389-1723.

GANDHI, N. N.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B. Studies on the lipozyme-catalyzed synthesis of butyl laurate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, n. 1, p. 1-12, 1995. ISSN 0006-3592.

GAO, Y.; TAN, T. W.; NIE, K. L.; WANG, F. Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 114-118, 2006. ISSN 1872-2075.

GARCIA, C. M. **Transesterificação de óleos vegetais**. 2006. 120 (Mestrado). Química Inorgânica, Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Química, Campinas.

GEBRIM, S. Palma gera oportunidade e sustentabilidade, diz LULA., 2010. Disponível em: < <http://www.biodieselbr.com/noticias/em-foco/palma-gera-oportunidade-sustentabilidade-lula-151010.htm> >. Acesso em: 27/12/2010.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAABOUNI, M.; GARGOURI, Y. 1-butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 4, p. 355-363, 2004. ISSN 0141-0229.

GILL, I.; BALLESTEROS, A. Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane, and hybrid sol-gel polymers: An efficient and generic approach. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 34, p. 8587-8598, 1998. ISSN 0002-7863.

GEORGOGIANNI, K. G.; KATSOULIDIS, A. K.; POMONIS, P. J.; MANOS, G.; KONTOMINAS, M. G. Transesterification of rapeseed oil for the production of biodiesel using homogeneous and heterogeneous catalysis. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 7-8, p. 1016-1022, 2009. ISSN 0378-3820.

GUISAN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa: Humana Press, 2006. ISBN 1588292908.

HAAS, M.; PIAZZA, G.; FOGLIA, T. Enzymatic approaches to the production of biodiesel fuels. In: KUO, T. M. and GARDNER, H. W. (Ed.). **Lipid Biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc., 2002. cap. 29, p.587-598.

HALIM, S. F. A.; KAMARUDDIN, A. H. Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a tert-butanol system. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 1436-1439, 2008. ISSN 1359-5113.

_____ KAMARUDDIN, A. H.; FERNANDO, W. J. N. Continuous

biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 710-716, 2009. ISSN 0960-8524.

HANSEN, T.; WAAGEN, V.; PARTALI, V.; ANTHONSEN, H. W.; ANTHONSEN, T. Co-solvent enhancement of enantioselectivity in lipase-catalysed hydrolysis of racemic esters. A process for production of homochiral C-3 building blocks using lipase B from *Candida antarctica*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 6, n. 2, p. 499-504, 1995. ISSN 0957-4166.

HE, Q.; XU, Y.; TENG, Y.; WANG, D. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, n. 1, p. 41-46, 2008. ISSN 0253-9837.

HELWANI, Z.; OTHMAN, M. R.; AZIZ, N.; FERNANDO, W. J. N.; KIM, J. Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 12, p. 1502-1514, 2009. ISSN 0378-3820.

HILLS, G. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, n. 10, p. 601-607, 2003. ISSN 1438-7697.

HSU, A. F.; JONES, K. C.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Continuous production of ethyl esters of grease using an immobilized lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 81, n. 8, p. 749-752, 2004. ISSN 0003-021X.

HUANG, G. H.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X. W.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 38-46, 2010. ISSN 0306-2619.

ISO, M.; CHEN, B. X.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2001. ISSN 1381-1177.

JACHMANIAN, I.; DOBROYAN, M.; MOLTINI, M.; SEGURA, N.;

IRIGARAY, B.; VEIRA, J. P.; VIEITEZ, I.; GROMPONE, M. A. Continuous Lipase-Catalyzed Alcoholysis of Sunflower Oil: Effect of Phase-Equilibrium on Process Efficiency. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 87, n. 1, p. 45-53, 2010. ISSN 0003-021X.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase: A Critical Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 253-264, 2008. ISSN 0738-8551.

JOSE, N. M.; PRADO, L. Hybrid organic-inorganic materials: Preparation and some applications. **Quimica Nova**, v. 28, n. 2, p. 281-288, 2005. ISSN 0100-4042.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 1, p. 12-15, 2001. ISSN 1389-1723.

KALAYASIRI, P.; JEYASHOKE, N.; KRISNANGKURA, K. Survey of seed oils for use as diesel fuels. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, n. 4, p. 471-474, 1996. ISSN 0003-021X.

KASHID, M. N.; KIWI-MINSKER, L. Microstructured Reactors for Multiphase Reactions: State of the Art. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 14, p. 6465-6485, 2009. ISSN 0888-5885.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1059-1070, 2005. ISSN 0378-3820.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. ISBN 9788521204053.

_____. STEIDLEY, K. R. Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound

structure and comparison to petrodiesel fuel components. **Fuel**, v. 84, n. 9, p. 1059-1065, 2005. ISSN 0016-2361.

KOMERS, K.; STLOUKAL, R.; MACHEK, J.; SKOPAL, F. Biodiesel from rapeseed oil, methanol and KOH 3. Analysis of composition of actual reaction mixture. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 103, n. 6, p. 363-371, 2001. ISSN 1438-7697.

KREINER, M.; FERNANDES, J. F. A.; O'FARRELL, N.; HALLING, P. J.; PARKER, M. C. Stability of protein-coated microcrystals in organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 33, n. 3-6, p. 65-72, 2005. ISSN 1381-1177.

_____. MOORE, B. D.; PARKER, M. C. Enzyme-coated microcrystals: a 1-step method for high activity biocatalyst preparation. **Chemical Communications**, n. 12, p. 1096-1097, 2001. ISSN 1359-7345.

KURKI, A.; HILL, A.; MORRIS, M. Biodiesel: The sustainability dimensions. **ATTRA – National Sustainable Agriculture Information Service**, p. 12, 2006. Disponível em: < http://www.attra.ncat.org/attra-pub/biodiesel_sustainable.html >. Acesso em: 14/01/2009.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic-solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 1, p. 81-87, 1987. ISSN 0006-3592.

LAUDANI, C. G.; HABULIN, M.; KNEZ, Z.; DELLA PORTA, G.; REVERCHON, E. Immobilized lipase-mediated long-chain fatty acid esterification in dense carbon dioxide: bench-scale packed-bed reactor study. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, n. 1, p. 74-81, 2007. ISSN 0896-8446.

LEE, T. S.; VAGHJIANI, J. D.; LYE, G. J.; TURNER, M. K. A systematic approach to the large-scale production of protein crystals. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 8, p. 582-592, 2000. ISSN 0141-0229.

LI, L. L.; DU, W.; LIU, D. H.; WANG, L.; LI, Z. B. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 43, n. 1-4, p. 58-62, 2006. ISSN 1381-1177.

LORA, E. S.; ANDRADE, R. V. Biomass as energy source in Brazil. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 4, p. 777-788, 2009. ISSN 1364-0321.

LU, J. K.; NIE, K. L.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. W. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp 99-125. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1367-1370, 2007. ISSN 1359-5113.

MA, F. R.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1-15, 1999. ISSN 0960-8524.

MA, L.; PERSSON, M.; ADLERCREUTZ, P. Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 1024-1029, 2002. ISSN 0141-0229.

MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 38-46, 2004.

MACEDO, I. C.; NOGUEIRA, L. A. H. **Biocombustíveis: Avaliação do Biodiesel no Brasil**. Brasília: Cadernos NAE 2004.

MAHABUBUR, M.; TALUKDER, R.; PUAH, S. M.; WU, J. C.; WON, C. J.; CHOW, Y. Lipase-catalyzed methanolysis of palm oil in presence and absence of organic solvent for production of biodiesel. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 24, n. 4, p. 257-262, 2006. ISSN 1024-2422.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable & Sustainable**

Energy Reviews, v. 11, n. 6, p. 1300-1311, 2007. ISSN 1364-0321.

MARVULLE, V.; NOGUEIRA, L. A. H.; LOPES, E. M.; OLIVEIRA, M. T. **Especificação Brasileira do Biodiesel: aspectos críticos e sua avaliação. 1º CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS VEGETAIS E BIODIESEL.** Varginha, Brasil 2004.

MEHER, L. C.; DHARMAGADDA, V. S. S.; NAIK, S. N. Optimization of alkali-catalyzed transesterification of *Pongamia pinnata* oil for production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 12, p. 1392-1397, 2006. ISSN 0960-8524.

_____. SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248-268, 2006. ISSN 1364-0321.

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel.** 2009. 194 (Doutorado). Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

MENDES, A. A.; BARBOSA, B. C. M.; DA SILVA, M. L. C. P.; DE CASTRO, H. F. Morphological, biochemical and kinetic properties of lipase from *Candida rugosa* immobilized in zirconium phosphate. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, p. 393-400, 2007. ISSN 1024-2422.

MIAO, X. L.; WU, Q. Y. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 841-846, 2006. ISSN 0960-8524.

MITTELBACH, M. Diesel fuel derived from vegetable oils .6. Specifications and quality control of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 56, n. 1, p. 7-11, 1996. ISSN 0960-8524.

MME. **Balanco energético nacional.** Brasília: Ministério de Minas e Energia 2009.

MONDALA, A.; LIANG, K. W.; TOGHIANI, H.; HERNANDEZ, R.; FRENCH, T. Biodiesel production by in situ transesterification of municipal primary and secondary sludges. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1203-1210, 2009. ISSN 0960-8524.

MOREIRA, A. B. R. **Seleção de fonte de lipase para síntese de biodiesel por transesterificação enzimática do óleo de palma com etanol**. 2007. 120 (Mestrado). Engenharia Química, Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena, Lorena.

MOREIRA, A. B. R. PEREZ, V. H.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy & Fuels**, v. 21, p. 3689-3694, 2007. ISSN 0887-0624.

MOURA, J. M. L. N.; GONCALVES, L. A. G.; GRIMALDI, R.; SOARES, M. D.; RIBEIRO, A. P. B. Otimização das condições de produção de ésteres etílicos a partir de óleo de peixe com elevado teor de ácidos graxos w-3. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 956-959, 2006.

MOURA, K. R. M.; SILVA, F. C.; BRANDÃO, K. S. R.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M. **Estabilidade Térmica do sebo bovino e do Biodiesel Metílico e Caracterização Físico-Química**. | CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL. Brasília 2006.

NAGAYAMA, K.; KARAIWA, K.; DOI, T.; IMAI, M. Esterification activity and stability of *Candida rugosa* lipase in AOT microemulsion-based organogels. **Biochemical Engineering Journal**, v. 2, n. 2, p. 121-126, 1998. ISSN 1369-703X.

NELSON, L. A.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, n. 9, p. 1191-1195, 1996. ISSN 0003-021X.

NIE, K. L. XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. W. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel

production. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 43, n. 1-4, p. 142-147, 2006. ISSN 1381-1177.

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 8, p. 692-700, 2008. ISSN 1438-7697.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 7, p. 769-777, 2005. ISSN 0960-8524.

NOVOZYMES. **Ficha de informação do produto** 2007.

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5146-5154, 2009. ISSN 0960-8524.

Óleo de palma. Disponível em: <
<http://www.campestre.com.br/oleo-de-palma.shtml>>. Acesso em:
12/06/2008.

Óleo de palma: O queridinho dos biocombustíveis. Jornal de Santa Catarina. Blumenau 2010.

OLIVEIRA, L. B. **Potencial de aproveitamento energético do lixo e de biodiesel de insumos residuais no Brasil**. 2004. 247 (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

OSORIO, N. M.; GUSMAO, J. H.; DA FONSECA, M. M.; FERREIRA-DIAS, S. Lipase-catalysed interesterification of palm stearin with soybean oil in a continuous fluidised-bed reactor. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, n. 7-8, p. 455-463, 2005. ISSN 1438-7697.

PAULA, A. V.; BARBOZA, J. C. D.; DE CASTRO, H. F. Study of the influence of solvent, carbohydrate and fatty acid in the

enzymatic synthesis of sugar esters by lipases. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 792-796, 2005. ISSN 0100-4042.

_____. MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; DE CASTRO, H. F.; BRUNO, L. M. Comparative performance of *Candida rugosa* lipase immobilized on polysiloxane polyvinyl alcohol hybrid support using different methodologies. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 35-40, 2008. ISSN 0100-4042.

_____. URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 281-288, 2007. ISSN 0268-2575.

PENTEADO, M. C. P. S. **Identificação dos gargalos e estabelecimento de um plano de ação para o sucesso do programa brasileiro de biodiesel**. 2005. 177 (Mestrado). Engenharia Automotiva, Universidade de São Paulo – Escola Politécnica, São Paulo.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. D.; DE ANDRADE, J. B. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1313-1330, 2005. ISSN 0103-5053.

QUINTELLA, C. M.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A.; NETO, P. R. C.; TORRES, E. A.; CASTRO, M. P.; JESUS, C. A. C. Biodiesel chain from the lab bench to the industry: An overview with technology assesment, R&D&I opportunities and tasks. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 793-808, 2009. ISSN 0100-4042.

RAITA, M.; CHAMPREDA, V.; LAOSIRIPOJANA, N. Biocatalytic ethanolysis of palm oil for biodiesel production using microcrystalline lipase in tert-butanol system. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 6, p. 829-834, 2010. ISSN 1359-5113.

RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMINGOS, A. K.; WILHELM, H. M. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio

ambiental para o Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, p. 28-37, 2003.

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 3975-3981, 2008. ISSN 0960-8524.

REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J.; RUFINSKA, A.; TESCHE, B. Characterization of hydrophobic sol-gel materials containing entrapped lipases. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 7, n. 1-2, p. 35-43, 1996. ISSN 0928-0707.

_____, ZONTA, A.; VIJAYAKRISHNAN, V.; SCHIMOSSEK, K. Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials: magnetic separation of heterogeneous biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis a-Chemical**, v. 134, n. 1-3, p. 251-258, 1998. ISSN 1381-1169.

RETUERT, J.; QUIJADA, R.; ARIAS, V.; YAZDANI-PEDRAM, M. Porous silica derived from chitosan-containing hybrid composites. **Journal of Materials Research**, v. 18, n. 2, p. 487-494, 2003. ISSN 0884-2914.

RICHARD, I. Em Belem, Lula destaca a produção brasileira de alimentos e de plantas usadas pela indústria., 2010. Disponível em: < <http://www.hojenoticias.com.br/negocios/em-belem-lula-destaca-producao-brasileira-de-alimentos-e-de-plantas-usadas-pela-industria/> >. Acesso em: 27/12/2010.

ROBLES-MEDINA, A.; GONZALEZ-MORENO, P. A.; ESTEBAN-CERDAN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 398-408, 2009. ISSN 0734-9750

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 648-653, 2007. ISSN 0960-8524.

SADANA, A. A Deactivation model for immobilized and soluble

enzymes. **Biotechnology Letters**, v. 2, n. 6, p. 279-284, 1980. ISSN 0141-5492.

SAKAI, T.; KAWASHIMA, A.; KOSHIKAWA, T. Economic assessment of batch biodiesel production processes using homogeneous and heterogeneous alkali catalysts. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3268-3276, 2009. ISSN 0960-8524.

SANTOS, J. C. **Processo fermentativo de obtenção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado: Avaliação das condições operacionais**. 2005. 199 (Doutorado). Engenharia Química, Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena, Lorena.

SANTOS, J. C.; CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; CONVERTI, A. Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in fluidized bed reactor. Effect of air flowrate. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 4, p. 1210-1215, 2003. ISSN 8756-7938.

_____. CONVERTI, A.; DE CARVALHO, W.; MUSSATTO, S. I.; DA SILVA, S. S. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in immobilized-cell fluidized bed reactor. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 113-118, 2005. ISSN 0032-9592.

_____. PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane-polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 52-3, p. 49-57, 2008. ISSN 1381-1177.

_____. PAULA, A. V.; ROCHA, C. G. F.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F. Morphological and mechanical properties of hybrid matrices of polysiloxane-polyvinyl alcohol prepared by sol-gel technique and their potential for immobilizing enzyme. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 354, n. 42-44, p. 4823-4826, 2008. ISSN 0022-3093.

SARAF, S.; THOMAS, B. Influence of feedstock and process chemistry on biodiesel quality. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 85, p. 360-364, 2007. ISSN 0957-

5820.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONCALVES, A. R. The petrochemical industry in the next century: How to replace petroleum as raw material. **Quimica Nova**, v. 24, n. 2, p. 247-251, 2001. ISSN 0100-4042.

_____. SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 3, p. 199-210, 1998. ISSN 0103-5053.

SELMİ, B.; GONTIER, E.; ERGAN, F.; THOMAS, D. Enzymatic synthesis of tricaprylin in a solvent-free system: Lipase regiospecificity as controlled by glycerol adsorption on silica gel. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 8, p. 543-547, 1997. ISSN 0951-208X.

SEVERAC, E.; GALY, O.; TURON, F.; PANTEL, C. A.; CONDORET, J. S.; MONSAN, P.; MARTY, A. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p. 61-70, 2011. ISSN 0141-0229.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 409-414, 2007. ISSN 1359-5113.

_____. SHARMA, A.; GUPTA, M. N. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. **Analytical Biochemistry**, v. 351, n. 2, p. 207-213, 2006. ISSN 0003-2697.

SHARMA, Y. C.; SINGH, B. Development of biodiesel from karanja, a tree found in rural India. **Fuel**, v. 87, n. 8-9, p. 1740-1742, 2008. ISSN 0016-2361.

SHAW, J. F.; CHANG, S. W.; LIN, S. C.; WU, T. T.; JU, H. Y.; AKOH, C. C.; CHANG, R. H.; SHIEH, C. J. Continuous enzymatic synthesis of biodiesel with Novozym 435. **Energy & Fuels**, v. 22, n. 2, p. 840-844, 2008. ISSN 0887-0624.

SHCHIPUNOV, Y. Sol-gel-derived biomaterials of silica and carrageenans. **Journal of colloid and interface science**, v. 268, n. 1, p. 68-76, 2003. ISSN 0021-9797.

SHEELU, G.; KAVITHA, G.; FADNAVIS, N. W. Efficient immobilization of lecithase in gelatin hydrogel and degumming of rice bran oil using a spinning basket reactor. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 85, n. 8, p. 739-748, 2008. ISSN 0003-021X.

SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; MINAMIGAWA, Y.; HIGASHIYAMA, K.; AKIMOTO, K.; FUJIKAWA, S.; KOMEMUSHI, S.; TOMINAGA, Y. Enzymatic enrichment of arachidonic acid from *Mortierella* single-cell oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 75, n. 9, p. 1213-1217, 1998. ISSN 0003-021X.

_____. SUGIHARA, A.; NAKANO, H.; KURAMOTO, T.; NAGAO, T.; GEMBA, M.; TOMINAGA, Y. Purification of docosahexaenoic acid by selective esterification of fatty acids from tuna oil with *Rhizopus delemar* lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 74, n. 2, p. 97-101, 1997. ISSN 0003-021X.

_____. WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p. 133-142, 2002. ISSN 1381-1177.

SIGMA. Sigma Product Information Sheet - TRITON X-100™. Disponível em: < <http://www.snowpure.com/docs/triton-x-100-sigma.pdf> >. Acesso em: Julho/2009.

SILVA, G. A. M. **Síntese enzimática, caracterização físico-química e térmica de biodiesel de sebo bovino por rota etílica**. 2009. 97 (Mestrado). Engenharia Química, Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena, Lorena.

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: o onus e o bônus

de produzir combustível. **Ciencia Rural**, v. 38, n. 3, p. 843-851, 2008. ISSN 0103-8478.

SILVA, T. O. M. **Síntese e caracterização de biocombustíveis obtidos a partir do arroz e seus derivados**. 2008. 93 (Mestrado). Engenharia e Tecnologia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SIMÕES, A.; MORI, R. Y.; FARIA, R.; DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A. Desempenho da matriz híbrida SiO₂-Quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Quimica Nova**, v. 36, n. 1, p. 33-38, 2011. ISSN 0100-4042.

SLOTEMA, W. F.; SANDOVAL, G.; GUIEYSSE, D.; STRAATHOF, A. J. J.; MARTY, A. Economically pertinent continuous amide formation by direct lipase-catalyzed amidation with ammonia. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 6, p. 664-669, 2003. ISSN 0006-3592.

SMITHA, S.; SHAJESH, P.; MUKUNDAN, P.; WARRIER, K. G. K. Sol-gel synthesis of biocompatible silica-chitosan hybrids and hydrophobic coatings. **Journal of Materials Research**, v. 23, n. 8, p. 2054, 2008.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-9, p. 745-757, 1999. ISSN 0273-2289.

_____. DOS SANTOS, O. A.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 39, n. 1-4, p. 69-76, 2006. ISSN 1381-1177.

SOLOMON, B. D.; BARNES, J. R.; HALVORSEN, K. E. Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. **Biomass & Bioenergy**, v. 31, n. 6, p. 416-425, 2007. ISSN 0961-9534.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 1, p. 97-103, 2003. ISSN 0141-0229.

SOUZA, C. A. Sistemas catalíticos na produção de biodiesel por meio de óleo residual. In: 6 ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 2006, Campinas. **Proceedings online...** Available from: <http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&p id=MSC0000000022006000200040&lng=en&nrm=abn>.

SOUZA, L. T. A. **Síntese enzimática do biodiesel de *Jatropha curca* L pela rota etílica**. 2010. (Mestrado). Engenharia Química, Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena, Lorena.

STEVENSON, D. E.; STANLEY, R. A.; FURNEAUX, R. H. Near-quantitative production of fatty-acid alkyl esters by lipase-catalyzed alcoholysis of fats and oils with adsorption of glycerol by silica-gel. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 6, p. 478-484, 1994. ISSN 0141-0229.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. Transformation of triglycerides into fuels, polymers and chemicals: Some applications of catalysis in oleochemistry. **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 667-676, 2007. ISSN 0100-4042.

_____. SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B. Oils and fat based biofuels: technological challenges. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 768-775, 2009. ISSN 0100-4042.

TALUKDER, M. M. R.; BEATRICE, K. L. M.; SONG, O. P.; PUAH, S.; WU, J. C.; WON, C. J.; CHOW, Y. Improved method for efficient production of biodiesel from palm oil. **Energy & Fuels**, v. 22, n. 1, p. 141-144, 2008. ISSN 0887-0624.

_____. WU, J. C.; VAN NGUYEN, T. B.; FEN, N. M.; MELISSA, Y. L. S. Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods. **Journal of**

Molecular Catalysis B-Enzymatic, v. 60, n. 3-4, p. 106-112, 2009. ISSN 1381-1177.

TAN, T. W.; LU, J. K.; NIE, K. L.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review (vol 28, pg 628, 2010). **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 937-937, 2010. ISSN 0734-9750.

_____. SHANG, F.; ZHANG, X. Current development of biorefinery in China. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 543-555, 2010. ISSN 0734-9750

TISCHER, W.; WEDEKIND, F. Immobilized enzymes: Methods and applications. **Biocatalysis - from Discovery to Application**, v. 200, p. 95-126, 1999. ISSN 0342-6793.

TOMASEVIC, A. V.; SILER-MARINKOVIC, S. S. Methanolysis of used frying oil. **Fuel Processing Technology**, v. 81, n. 1, p. 1-6, 2003. ISSN 0378-3820.

TONGBORIBOON, K.; CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 67, n. 1-2, p. 52-59, 2010. ISSN 1381-1177.

TORRES, C. F.; VAZQUEZ, L.; SENORANS, F. J.; REGLERO, G. Enzymatic synthesis of short-chain diacylated alkylglycerols: A kinetic study. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 1025-1031, 2009. ISSN 1359-5113.

TORRES, F. C. C. **Estudo da utilização do biodiesel para geração de energia elétrica no Brasil**. 2006. 115 (Mestrado). Engenharia Mecânica, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

URIOSTE, D. **Produção de biodiesel por catálise enzimática do óleo de babaçu com alcoóis de cadeia curta**. 2004. 123 (Mestrado). Engenharia Química, Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena, Lorena.

URIOSTE, D.; CASTRO, M. B. A.; BIAGGIO, F. C.; DE CASTRO, H. F. Synthesis of chromatographic standards and establishment of a method for the quantification of the fatty ester composition of biodiesel from babassu oil. **Quimica Nova**, v. 31, n. 2, p. 407-412, 2008. ISSN 0100-4042.

VALÉRIO, A.; ROVANI, S.; TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Enzymatic glycerolysis of olive oil in solvent-free systems using food grade surfactants. XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS**. Natal, Brasil 2009.

VAN DER WALLE, G. A. M. BUISMAN, G. J. H.; WEUSTHUIS, R. A.; EGGINK, G. Development of environmentally friendly coatings and paints using medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) as the polymer binder. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, n. 1-3, p. 123-128, 1999. ISSN 0141-8130.

VAN GERPEN, J. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1097-1107, 2005. ISSN 0378-3820.

VAN GERPEN, J.; SHANKS, B.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D.; KNOTHE, G. **Biodiesel Production Technology**. Colorado: National Renewable Energy Laborator, 2004.

VEIGA FILHO, A. A. **Novo ciclo do Proálcool: Problemas derivados do aumento da produção do etanol**. Revista Eletrônica de Jornalismo Científico 2008.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: Facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997. ISSN 0167-7799.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000. ISSN 1381-1177.

WANG, L.; DU, W.; LIU, D. H.; LI, L. L.; DAI, N. M. Lipase-

catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 43, n. 1-4, p. 29-32, 2006. ISSN 1381-1177.

WANG, Y.; MA, S.; ZHAO, M.; KUANG, L.; NIE, J.; RILEY, W. W. Improving the cold flow properties of biodiesel from waste cooking oil by surfactants and detergent fractionation. **Fuel**, v. 90, n. 3, p. 1036-1040, 2011. ISSN 0016-2361.

WATANABE, Y.; KUWABARA, K.; ADACHI, S.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R. Production of saturated acyl L-ascorbate by immobilized lipase using a continuous stirred tank reactor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4628-4632, 2003. ISSN 0021-8561.

_____. PINSIRODOM, P.; NAGAO, T.; KOBAYASHI, T.; NISHIDA, Y.; TAKAGI, Y.; SHIMADA, Y. Production of FAME from acid oil model using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 82, n. 11, p. 825-831, 2005. ISSN 0003-021X.

_____. SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 77, n. 4, p. 355-360, 2000. ISSN 0003-021X.

_____. SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 78, n. 7, p. 703-707, 2001. ISSN 0003-021X.

_____. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p. 151-155, 2002. ISSN 1381-1177.

WEETALL, H. H.; PITCHER, W. H. Scaling up an immobilized enzyme-system. **Science**, v. 232, n. 4756, p. 1396-1403, 1986. ISSN 0036-8075.

WILLIS, W. M.; MARANGONI, A. G. Assessment of lipase- and chemically catalyzed lipid modification strategies for the production of structured lipids. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 76, n. 4, p. 443-450, 1999. ISSN 0003-021X.

WILLSON, R. M.; WIESMAN, Z.; BRENNER, A. Analyzing alternative bio-waste feedstocks for potential biodiesel production using time domain (TD)-NMR. **Waste Management**, v. 30, n. 10, p. 1881-1888, 2010. ISSN 0956-053X.

WINAYANUWATTIKUN, P.; KAEWPIBOON, C.; PIRIYAKANANON, K.; TANTONG, S.; THAKERNKARNKIT, W.; CHULALAKSANANUKUL, W.; YONGVANICH, T. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. **Biomass & Bioenergy**, v. 32, n. 12, p. 1279-1286, 2008. ISSN 0961-9534.

WUST, E. **Estudo da viabilidade técnico científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos**. 2004. 113 (Mestrado). Engenharia Ambiental, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau.

XIE, K.; YU, Y.; SHI, Y. Synthesis and characterization of cellulose/silica hybrid materials with chemical crosslinking. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 799-805, 2009. ISSN 0144-8617.

XU, Y. Y.; DU, W.; LIU, D. H.; ZENG, J. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 15, p. 1239-1241, 2003. ISSN 0141-5492.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 438-450, 1998. ISSN 0141-0229.

ZANIN, G. M. **Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada**. 1989. 454 (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos,

Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas Imobilizadas. In: SAIAD, S. e PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

Apêndice

A. DADOS UTILIZADOS NO CÁLCULO DO RENDIMENTO

Ácidos Graxos	Óleo de palma (%) ⁽¹⁾	Massa Molar dos ácidos graxos (g mol ⁻¹)	Massa Molar dos ésteres de etila (g mol ⁻¹)
Láurico - C12	0,1	200,32	228,32
Mirístico - C14	1,2	228,37	256,37
Palmítico - C16	46,8	256,42	284,42
Esteárico - C18	3,8	284,47	312,47
Oléico - C18:1	37,6	280,44	310,46
Linoléico - C18:2	10,0	280,44	308,44

⁽¹⁾ A análise da porcentagem dos ácidos graxos no óleo de palma foi realizada no Laboratório de Biocatálise da USP-EEL.

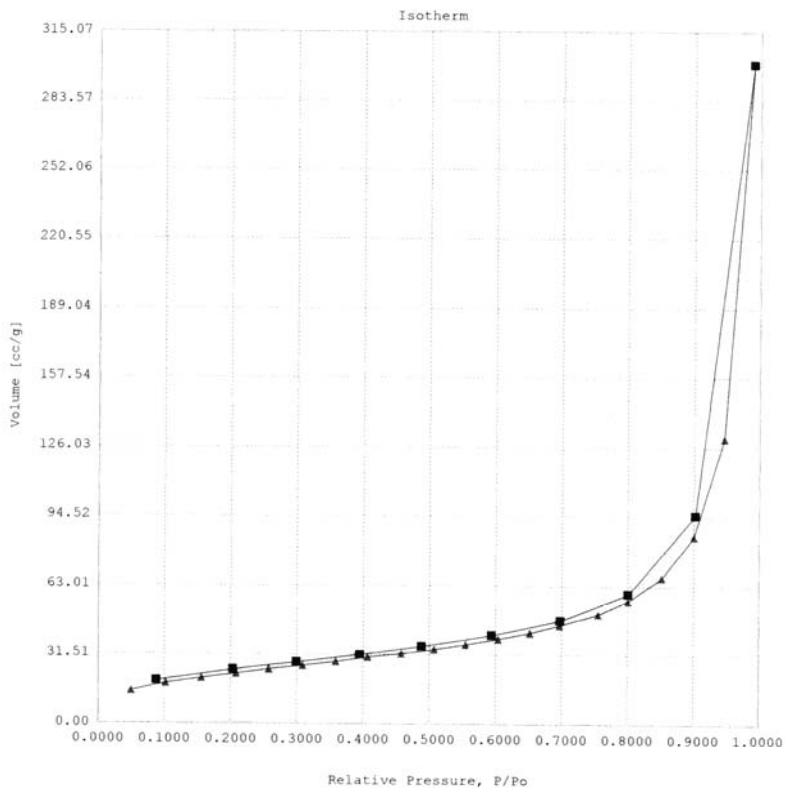
B. RESULTADOS DA ANÁLISE DE BET

(a) Lipase Novozym® 435

02/22/2010

Quantachrome Instruments
Quantachrome Autosorb Automated Gas Sorption System Report
Autosorb 1 for Windows 1.53

File name:	C:\QCdata\PhysData\Gisanara\novozyme 435.raw		
Sample ID:	Gisa_novozym435	Description:	Novozyme 435
Comments:			
Operator:	valdete	Sample weight:	0.1112 g
Analysis gas:	Nitrogen	X sect. area:	16.2 Å ² /molec
Adsorbate (DRP):	Nitrogen	Bath Temp.:	77.30
Outgas Temp:	100.0 °C	Outgas Time:	3.0 hrs
P/Po tolerance:	5	Equil. time:	3
Station #:	1	PC sw. version:	1.53
		Non-ideality:	6.58e-05
		Analysis Time:	358.0 min
		End of run:	12/02/2009 21:31
		TempComp:	On

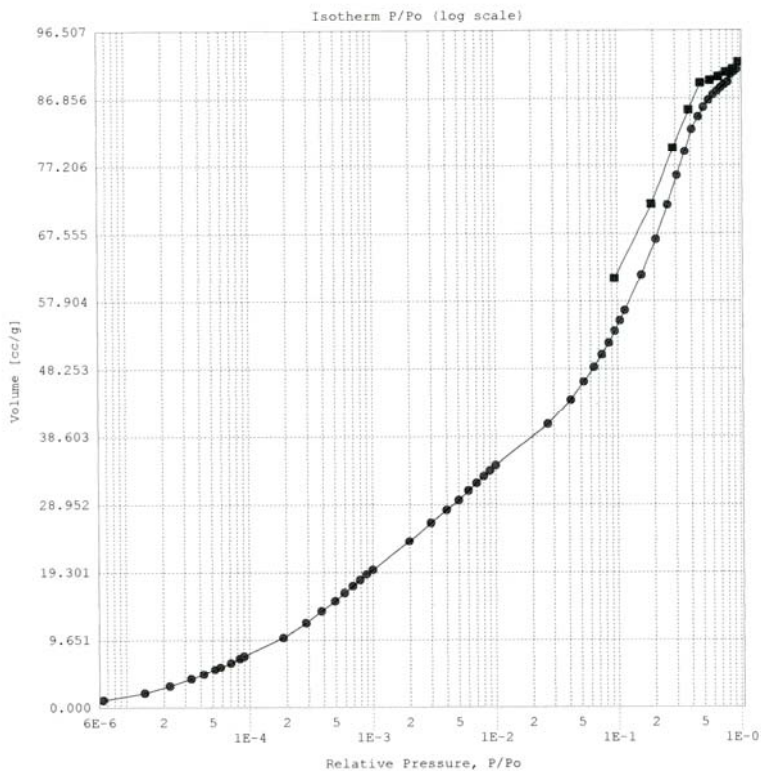


(b) Lipase AK (SiO₂-PVA)

02/01/2010

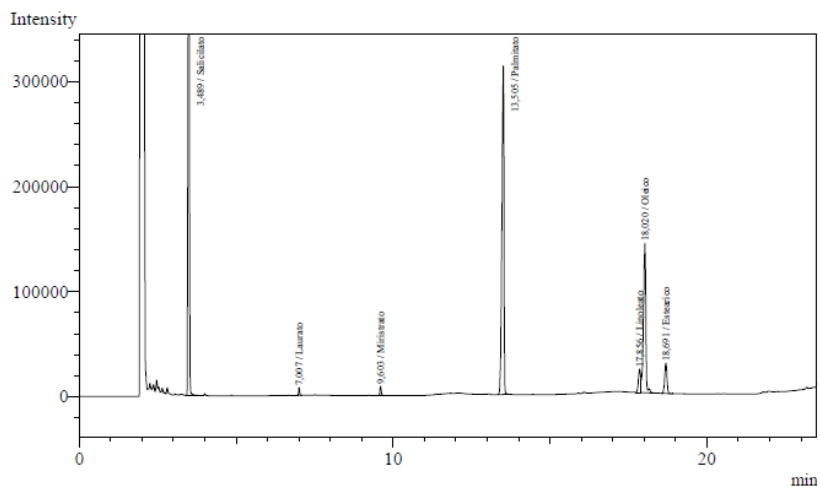
Quantachrome Instruments
Quantachrome Autosorb Automated Gas Sorption System Report
Autosorb 1 for Windows 1.53

File name: C:\QCdata\PhysData\AS012801.raw		
Sample ID: Gisanara - AK - 10	Description: [-1Gisanara - AK - 100 graus 28-01-10	
Comments:		
Operator: D. Diniz	Sample weight: 0.0624 g	
Analysis gas: Nitrogen	X sect. area: 16.2 Å ² /molec	Non-ideality: 6.58e-05
Adebate (DRP): Nitrogen	Bath Temp.: 77.30	
Outgas Temp: 300.0 °C	Outgas Time: 3.0 hrs	Analysis Time: 1393.3 min
P/Po tolerance: 5	Equil. time: 3	End of run: 02/01/2010 16:27
Station #: 1	PC sw. version: 1.53	TempComp: On

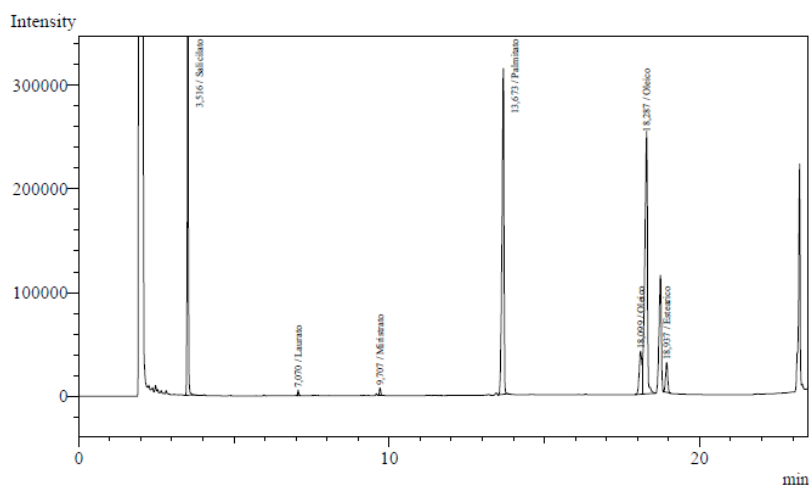


C. CROMATOGRAMAS DOS ENSAIOS REALIZADOS EM REATOR TIPO LEITO FIXO E TANQUE AGITADO COM CESTA COM A LIPASE NOVOZYM® 435.

(a) Experimento 8, ausência de solvente e amostra de reação de 240

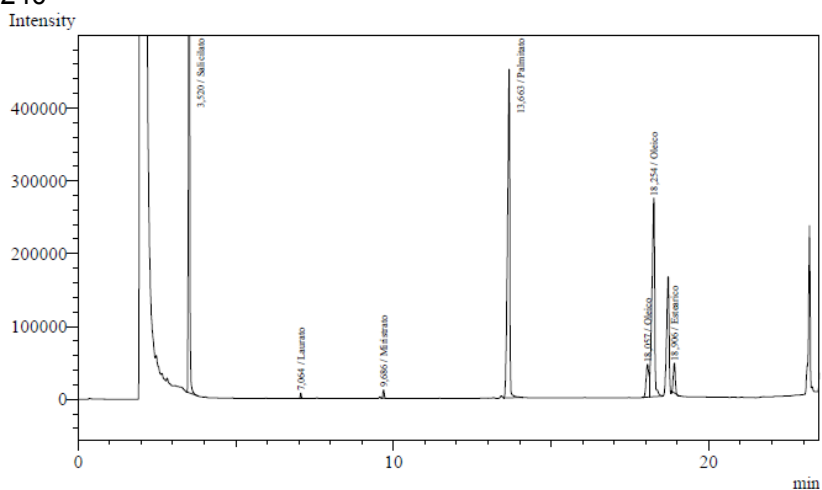


Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	3.489	2069543	747163	0.000	ppm		1	Salicilato
2	7.007	16676	5083	0.000	ppm		2	Laurato
3	9.603	24966	7607	0.000	ppm		3	Miristato
4	13.505	1427266	300878	0.000	ppm		4	Palmitato
5	17.856	114972	21145	0.000	ppm		5	Linoleato
6	18.020	750349	137579	0.000	ppm	V	6	Oleico
7	18.691	146188	27734	0.000	ppm		7	Estearico
Total		4549960	1247189					

(b) Experimento 9, presença de solvente e amostra de reação de 240

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit Mark	ID#	Cmpd Name
1	3.516	1073594	407576	0.000	ppm	1	Salicilato
2	7.070	11158	4498	0.000	ppm	2	Laurato
3	9.707	21062	6892	0.000	ppm	3	Miristato
4	13.673	1402914	300879	0.000	ppm	4	Palmitato
5	18.099	247599	40615	0.000	ppm	6	Oleico
6	18.287	1518398	247120	0.000	ppm	V 6	Oleico
7	18.937	136302	27799	0.000	ppm	7	Estearico
Total		4411027	1035379				

(c) Experimento 11, presença de solvente e amostra de reação de 240



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit Mark	ID#	Cmpd Name
1	3.520	2245907	686833	0.000	ppm	1	Salicilato
2	7.064	15678	5832	0.000	ppm	2	Laurato
3	9.686	32091	10536	0.000	ppm	3	Miristrato
4	13.663	2235763	402363	0.000	ppm	4	Palmitato
5	18.057	250828	42660	0.000	ppm	6	Oleico
6	18.254	1704924	250748	0.000	ppm V	6	Oleico
7	18.906	170625	39848	0.000	ppm	7	Estearico
Total		6655816	1438820				

Anexo

A. UNIDADES DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL AUTORIZADAS PARA OPERAÇÃO E UNIDADES AUTORIZADAS PARA OPERAÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO

Empresa	Município	UF	Capacidade autorizada (m ³ dia ⁻¹)	Autorizações Vigentes	
				Autorização para Operação	Autorização para Comercialização
ABDIESEL	Araguari	MG	6	Nº 173, de 25/03/2009 DOU de 26/03/09	Nº 63, de 08/02/2010 DOU de 09/02/10
ABDIESEL	Varginha	MG	2,40	Nº 173, de 18/07/2007 DOU de 20/07/07	Nº 705, de 13/12/2010 DOU de 14/12/10
ADM	Rondonópolis	MT	955	Nº 529, de 28/10/2009 DOU de 29/10/09	Nº 557, de 09/11/2009 DOU de 10/11/09
AGRENCO	Alto Araguaia	MT	660	Nº 18, de 16/01/2008 DOU de 17/01/08	Nº 373, de 22/06/2010 DOU de 23/06/10
AGROPALMA	Belém	PA	80	Nº 94, de 31/03/2005 DOU de 01/04/05	Nº 275, de 28/05/2009 DOU de 29/05/09
AGROSOJA	Sorriso	MT	80	Nº 85, de 14/05/2007 DOU de 15/05/07	Nº 65, de 02/02/2009 DOU de 03/02/09
AMAZONBIO	Ji Paraná	RO	20	Nº 283, de 20/05/2010 DOU de 21/05/10	Nº 284, de 20/05/2010 DOU de 21/05/10
ARAGUASSÚ	Porto Alegre do Norte	MT	100	Nº 235, de 28/08/2007 DOU de 29/08/07	Nº 128, de 26/02/2009 DOU de 27/02/09
B-100	Araxá	MG	30	Nº 180, de 13/05/2008 DOU de 14/05/08	Nº 121, de 26/02/2009 DOU de 27/02/09
BARRALCOOL	Barra dos Bugres	MT	190,46	Nº 336, de 18/12/2006 DOU de 19/12/06	Nº 587, de 17/12/2008 DOU de 18/12/08
BEIRA RIO	Terra Nova do Norte	MT	12	Nº 540, de 05/11/2009 DOU de 06/11/09	Nº 570, de 11/11/2009 DOU de 12/11/09
BIG FRANGO	Rolândia	PR	40	Nº 19, de 16/01/2008 DOU de 17/01/08	—

BINATURAL	Formosa	GO	450	Nº 745, de 29/12/2010 DOU de 30/12/10	Nº 569, de 11/11/2009 DOU de 12/11/09
BIO ÓLEO	Cuiabá	MT	10	Nº 179, de 13/05/2008 DOU de 14/05/08	Nº 591, de 19/12/2008 DOU de 22/12/08
BIO PETRO	Araraquara	SP	16,7	Nº 223, de 04/05/2010 DOU de 05/05/10	Nº 477, de 30/07/2010 DOU de 02/08/10
BIO VIDA	Várzea Grande	MT	18	Nº 169, de 08/04/2010 DOU de 09/04/10	Nº 633, de 13/10/2010 DOU de 14/10/10
BIOBRAX	Una	BA	98	Nº 747, de 29/12/2010 DOU de 30/12/10	—
BIOCAMP	Campo Verde	MT	300	Nº 347, de 09/06/2010 DOU de 10/06/10	Nº 420, de 12/07/2010 DOU de 13/07/10
BIOCAPITAL	Charqueada	SP	824	Nº 395, de 01/11/2007 DOU de 05/11/07	Nº 13, de 12/01/2009 DOU de 13/01/09
BIOCAR	Dourados	MS	30	Nº 360, de 02/09/2008 DOU 03/09/08	Nº 119, de 26/02/2009 DOU de 27/02/09
BIOLIX	Rolândia	PR	30	Nº 165, de 17/05/2005 DOU de 18/05/05	Nº 73, de 04/02/2009 DOU de 05/02/09
BIONORTE	São Miguel do Araguaia	GO	94,70	Nº 365, de 09/09/2008 DOU 10/09/08	—
BIOPAR	Rolândia	PR	120	Nº 127, de 21/06/2007 DOU de 22/06/07	Nº 103, de 18/02/2009 DOU de 19/02/09
BIOPAR	Nova Marilândia	MT	100	Nº 69, de 09/02/2010 DOU de 10/02/10	Nº 129, de 17/03/2010 DOU de 18/03/10
BIOSEP	Três Pontas	MG	36	Nº 713, de 15/12/2010 DOU de 16/12/10	—
BIOTINS	Paraíso do Tocantins	TO	81	Nº 224, de 04/05/2010 DOU de 05/05/10	Nº 261, de 12/05/2010 DOU de 13/05/10
BIOVERDE	Taubaté	SP	503,27	Nº 712, de 15/12/2010 DOU de 16/12/10	Nº 594, de 19/12/2008 DOU de 22/12/08
BRASIL ECODIESEL	Iraquara	BA	360	Nº 319, de 23/11/2006 DOU de 27/11/06	Nº 90, de 16/02/2009 DOU de 17/02/09

BRASIL ECODIESEL	Porto Nacional	TO	360	Nº 84, de 14/05/2007 DOU de 15/05/07	Nº 92, de 16/02/2009 DOU de 17/02/09
BRASIL ECODIESEL	Rosário do Sul	RS	360	Nº 111, de 08/06/2007 DOU de 11/06/07	Nº 91, de 16/02/2009 DOU de 17/02/09
BRASIL ECODIESEL	São Luís	MA	360	Nº 76, de 27/04/2007 DOU de 30/04/07	Nº 93, de 16/02/2009 DOU de 17/02/09
BSBIOS	Passo Fundo	RS	444	Nº 220, de 12/05/2009 DOU de 13/05/09	Nº 264, de 26/05/2009 DOU de 27/05/09
BSBIOS MARIALVA	Marialva	PR	353	Nº 225, de 04/05/2010 DOU de 05/05/10	Nº 259, de 12/05/2010 DOU de 13/05/10
CAMERA	Ijuí	RS	400	Nº 650, de 26/10/2010 DOU de 27/10/10	Nº 675, de 16/11/2010 DOU de 17/11/10
CARAMURU	São Simão	GO	625	Nº 508, de 19/11/2008 DOU de 20/11/08	Nº 605, de 31/12/2008 DOU de 02/01/09
CARAMURU	Ipameri	GO	625	Nº 226, de 04/05/2010 DOU de 05/05/10	Nº 345, de 09/06/2010 DOU de 10/06/10
CESBRA	Volta Redonda	RJ	60	Nº 127, de 08/04/2008 DOU de 09/04/08	Nº 113, de 19/02/2009 DOU de 20/02/09
CLV	Colider	MT	100	Nº 458, de 12/12/2007 DOU de 13/12/07	Nº 127, de 26/02/2009 DOU de 27/02/09
COMANCHE	Simões Filho	BA	335	Nº 406, de 09/11/2007 DOU de 12/11/07	Nº 115, de 19/02/2009 DOU de 20/02/09
COOMISA	Sapezal	MT	12	Nº 486, de 28/12/2007 DOU de 31/12/07	Nº 604, de 31/12/2008 DOU de 02/01/09
COOPERBIO	Cuiabá	MT	340	Nº 25, de 13/01/2009 DOU de 14/01/09	Nº 64, de 02/02/2009 DOU de 03/02/09
COOPERBIO	Lucas do Rio Verde	MT	10	Nº 236, de 28/08/2007 DOU de 29/08/07	—
COOPERFELIZ	Feliz Natal	MT	10	Nº 485, de 28/12/2007 DOU de 31/12/07	Nº 617, de 08/12/2009 DOU de 09/12/09
DELTA	Rio Brilhante	MS	300	Nº 659, de 04/11/2010 DOU de	Nº 674, de 16/11/2010 DOU de 17/11/10

				05/11/10	
DVH	Tailândia	PA	35	Nº 126, de 08/04/2008 DOU de 09/04/08	Nº 129, de 26/02/2009 DOU de 27/02/09
FERTIBOM	Catanduva	SP	333,3	Nº 557, de 10/09/2010 DOU de 13/09/10	Nº 645, de 25/10/2010 DOU de 26/10/10
FIAGRIL	Lucas do Rio Verde	MT	409,96	Nº 267, de 12/09/2007 DOU de 13/09/07	Nº 586, de 16/12/2008 DOU de 17/12/08
FUSERMANN	Barbacena	MG	30	Nº 350, de 22/12/2006 DOU de 26/12/06	—
GRANOL	Cachoeira do Sul	RS	933,33	Nº 221, de 12/05/2009 DOU de 13/05/09	Nº 256, de 21/05/2009 DOU de 22/05/09
GRANOL	Anápolis	GO	613	Nº 509, de 19/11/2008 DOU de 20/11/08	Nº 51, de 27/01/2009 DOU de 28/01/09
GRUPAL	Sorriso	MT	120	Nº 222, de 04/05/2010 DOU de 05/05/10	Nº 262, de 12/05/2010 DOU de 13/05/10
INNOVATTI	Mairinque	SP	30	Nº 196, de 01/08/2007 DOU de 02/08/07	Nº 567, de 11/11/2009 DOU de 12/11/09
JBS	Lins	SP	560,23	Nº 16, de 12/01/2010 DOU de 14/01/10	Nº 55, de 02/02/2010 DOU de 03/02/10
OLEOPLAN	Veranópolis	RS	1.050	Nº 640, de 21/10/2010 DOU de 22/10/10	Nº 654, de 28/10/2010 DOU de 29/10/10
OLFAR	Erechim	RS	600	Nº 210, de 28/04/2010 DOU de 29/04/10	Nº 260, de 12/05/2010 DOU de 13/05/10
OURO VERDE	Rolim de Moura	RO	9	Nº 392, de 01/07/2010 DOU de 02/07/10	Nº 393, de 01/07/2010 DOU de 02/07/10
PETROBRAS BIOCOMBUSTÍVEL	Candeias	BA	603,42	Nº 528, de 26/08/2010 DOU de 27/08/10	Nº 653, de 28/10/2010 DOU de 29/10/10
PETROBRAS BIOCOMBUSTÍVEL	Quixadá	CE	301,71	Nº 558, de 09/11/2009 DOU de 10/11/09	Nº 568, de 11/11/2009 DOU de 12/11/09
PETROBRAS BIOCOMBUSTÍVEL	Montes Claros	MG	301,71	Nº 545, de 05/11/2009 DOU 06/11/09	Nº 562, de 10/11/2009 DOU de 11/11/09
RONDOBIO	Rondonópolis	MT	10	Nº 487, de 28/12/2007	—

SP BIO	Sumaré	SP	83,28	DOU de 31/12/07 Nº 560, de 09/11/2009 DOU de 10/11/09	Nº 572, de 11/11/2009 DOU de 12/11/09
SSIL	Rondonópolis	MT	20	Nº 349, de 09/06/2010 DOU de 10/06/10	Nº 348, de 09/06/2010 DOU de 10/06/10
TAUÁ	Nova Mutum	MT	100	Nº 216, de 11/06/2008 DOU de 12/06/08	—
TECNODIESEL	Sidrolândia	MS	11	Nº 13, de 12/01/2010 DOU 14/01/10	Nº 207, de 26/04/2010 DOU de 27/04/10
TRANSPORTADORA CAIBIENSE	Rondonópolis	MT	100	Nº 606, de 01/12/2009 DOU de 02/12/09	Nº 647, de 22/12/2009 DOU de 23/12/09
USIBIO	Sinop	MT	20	Nº 90, de 16/05/2007 DOU de 17/05/07	—

	Quantidade	(m ³ dia ⁻¹)
Unidades autorizadas para operação e comercialização	9	438,70
Unidades autorizadas somente para operação ²	57	15.341,94
TOTAL (Unidades autorizadas para operação) ¹	66	16.216,47

NOTAS:

(1) Capacidade estabelecida na Autorização para Operação.

(2) Capacidade estabelecida na Autorização para Comercialização.

B. ESPECIFICAÇÃO DO BIODIESEL

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	ABNT NBR	MÉTODO ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1)	-	-	-
Massa específica a 20 °C	kg m ⁻³	850-900	7148	1298	EN/ISO 3675
			14065	4052	-
					EN/ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40 °C	Mm ² s ⁻¹	3,0-6,0	10441	445	EN/ISO 3104
Teor de Água, máx. (2)	mg kg ⁻¹	500	-	6304	EN/ISO 12937
Contaminação Total, máx.	mg kg ⁻¹	24	-	-	EN/ISO 12662
Ponto de fulgor, mín. (3)	°C	100,0	14598	93	EN/ISO 3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-	EN 14103
Resíduo de carbono (4)	% massa	0,050	15586	4530	-
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020	6294	874	EN/ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg kg ⁻¹	50	-	5453	-
			-		EN/ISO 20846
					EN/ISO 20884
Sódio + Potássio, máx.	mg kg ⁻¹	5	15554	-	EN 14108
			15555		EN 14109
			15553		EN 14538
			15556		
Cálcio + Magnésio, máx.	mg kg ⁻¹	5	15553	-	EN 14538
			15556		
Fósforo, máx.	mg kg ⁻¹	10	15553	4951	EN 14107
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1	14359	130	EN/ISO 2160
Número de Cetano (5)	-	Anotar	-	613 6890 (6)	EN/ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	19 (7)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mgKOH g ⁻¹	0,50	14448	664	-
			-	-	EN 14104 (8)

			15341		-
			15771	6584 (8)	
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	-	-	EN 14105 (8)
			-		EN 14106 (8)
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344	6584 (8)	-
			-	-	EN 14105 (10)
Mono, di, triacilglicerol (5)	% massa	Anotar	15342	6584 (8)	-
			15344		EN 14105 (8)
Metanol ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110
Índice de Iodo (5)	g 100g ⁻¹	Anotar	-	-	EN 14111
Estabilidade à oxidação a 110 °C, mín.(2)	h	6	-	-	EN 14112 (8)

Nota:

- (1) Límpido e isento de impurezas com anotação da temperatura de ensaio.
- (2) O limite indicado deve ser atendido na certificação do biodiesel pelo produtor ou importador.
- (3) Quando a análise de ponto de fulgor resultar em valor superior a 130°C fica dispensada a análise de teor de metanol ou etanol.
- (4) O resíduo deve ser avaliado em 100% da amostra.
- (5) Estas características devem ser analisadas em conjunto com as demais constantes da tabela de especificação a cada trimestre civil. Os resultados devem ser enviados pelo produtor de biodiesel à ANP, tomando uma amostra do biodiesel comercializado no trimestre e, em caso de neste período haver mudança de tipo de matéria-prima, o produtor deverá analisar número de amostras correspondente ao número de tipos de matérias-primas utilizadas.
- (6) Poderá ser utilizado como método alternativo o método ASTM D6890 para número de cetano.
- (7) O limite máximo de 19°C é válido para as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Bahia, devendo ser anotado para as demais regiões. O biodiesel poderá ser entregue com temperaturas superiores ao limite supramencionado, caso haja acordo entre as partes envolvidas. Os métodos de análise indicados não podem ser empregados para biodiesel oriundo apenas de mamona.
- (8) Os métodos referenciados demandam validação para as matérias-primas não previstas no método e rota de produção etílica."